

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской Академии Наук  
(ИЭФБ РАН)

*На правах рукописи*



**БАТАЛОВА Анастасия Александровна**

**МОДУЛЯЦИЯ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА**

1.5.4 – Биохимия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Гончаров Николай Васильевич

Симферополь, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Эволюционные, генетические и структурные особенности альбумина .....	13
1.2. Эстеразная и псевдоэстеразная активность альбумина .....	17
1.3. Кинетика ферментативных реакций с участием альбумина .....	18
1.4. Модуляция связывающей и ферментативной активности альбумина.....	27
1.4.1. Аллостерические эффекты в молекуле альбумина .....	27
1.4.2. Модуляция активности альбумина жирными кислотами .....	28
1.4.3. Модуляция активности альбумина полифенолами .....	29
1.4.4. Модуляция активности альбумина редокс-соединениями .....	29
1.5. Видовые различия в структурных и функциональных характеристиках альбумина.....	31
1.6. Методы изучения связывающей и ферментативной активности альбумина	33
1.6.1. Применение метода ЯМР-спектроскопии в изучении кинетики биохимических процессов .....	33
1.6.2. Спектрофотометрический метод определения скорости ферментативных реакций .....	34
1.6.3. Методы молекулярного моделирования .....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	39
2.1. Дизайн эксперимента.....	39
2.2. Материалы и реагенты .....	41
2.3. ЯМР спектроскопия.....	41
2.4. Электрофорез альбумина в полиакриламидном геле .....	42
2.5. Определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии альбумина методом спектрофотометрии .....	42

2.6. Влияние модуляторов на эстеразную активность сывороточного альбумина 43	
2.7. Влияние окисления свободных тиоловых групп БСА на его связывающую и эстеразную активность.....	44
2.8. Молекулярные механизмы аллостерических эффектов в альбумине по данным молекулярного моделирования .....	47
2.8.1. Подготовка трехмерных моделей .....	47
2.8.2. Метод молекулярного докинга .....	48
2.8.3. Метод молекулярной динамики.....	48
2.8.4. Оценка свободной энергии связывания.....	49
2.8.5. Валидация методов молекулярного моделирования.....	50
2.9. Статистическая обработка данных.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1. Эстеразная активность сывороточного альбумина по данным ЯМР .....	53
3.2. Поиск возможных сайтов истинно эстеразной активности БСА методами молекулярного моделирования.....	63
3.3. Влияние окисления тиоловой группы Cys34 на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина по отношению к НФА.....	68
3.3.1. Влияние восстановления тиоловой группы БСА на его связывающие и эстеразные свойства по отношению к НФА в эксперименте <i>in vitro</i> .....	69
3.3.2. Влияние цистеинилирования тиоловой группы БСА на его связывающие и эстеразные свойства по отношению к НФА в эксперименте <i>in silico</i> .....	71
3.4. Влияние окисления тиоловой группы ЧСА и БСА на их связывающие и эстеразные свойства по отношению к параоксону в эксперименте <i>in silico</i> .....	75
3.4.1. Подготовка трехмерных моделей ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34.....	76
3.4.2. Сайт Садлоу I.....	77
3.4.3. Сайт Садлоу II .....	85
3.4.4. Оценка свободных энергий образования комплексов параоксона с альбумином .....	90

3.5. Влияние редокс-статуса сывороточного альбумина на его функциональные характеристики в условиях <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> и <i>in silico</i> : сравнительный анализ ...	95
3.6. Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина.....	99
3.7. Влияние полифенолов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина.....	106
3.8. Определение влияния диазепама и карбоксима на скорость гидролиза НФА в присутствии БСА .....	112
4. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	128

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы.

Сывороточный альбумин (СА) – это основной белок крови млекопитающих, концентрация СА в плазме составляет примерно 600 мкМ. Роль альбумина состоит в поддержании коллоидно-осмотического давления, транспортировке воды, разнообразных ионов и соединений эндогенного и экзогенного происхождения [45, 54, 125]. Связывая многие лекарственные препараты и токсические вещества, альбумин вносит весомый вклад в их фармако- и токсикокинетику. Известно о трех основных сайтах взаимодействия СА с лигандами (Садлоу I, Садлоу II и сайт III) [138].

В конце 1950-х годов было выдвинуто предположение о том, что помимо связывающей способности альбумин обладает гидролитической активностью. С того времени накапливаются данные о псевдоэстеразной (необратимое ковалентное связывание субстрата с белком) и эстеразной (связывание субстрата с активным центром альбумина с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) активности СА [4, 45, 125]. Доказано, что сайт Садлоу II с каталитически активным Tyr411 отвечает за псевдоэстеразную активность белка [95, 99]. Ранее было высказано предположение, что сайт Садлоу I с каталитическим Tyr150 отвечает за истинно эстеразную активность альбумина [2, 4]. Тем не менее, молекулярные механизмы гидролитической активности альбумина до конца не определены, и их изучение является актуальной задачей современной биохимии.

Для молекулы альбумина характерна аллостерическая модуляция – взаимодействие лиганда с одним из сайтов влияет на связывание и/или скорость гидролиза в другом сайте [20]. Имеются данные о том, что в молекуле альбумина происходят конформационные изменения после связывания некоторых эндогенных лигандов, переносимых по кровеносному руслу, таких как мочевины [154], эстрадиол [42], билирубин [81]. Взаимодействие альбумина с глюкозой также приводит к изменению конформации этого белка и влияет на его связывающие свойства [25, 125]. Альбумин является основным транспортным

белком для переноса жирных кислот (ЖК) по сосудистому руслу [157]. Во многих работах показано влияние ЖК на сродство альбумина к различным лигандам [44, 69, 147, 158]. В кровеносном русле примерно 30% молекул альбумина являются окисленными по тиоловой группе Cys34 [47], а при некоторых патологических состояниях организма процент окисленных молекул может достигать 70% [114]. Известно, что окисление свободной тиоловой группы СА приводит к конформационным изменениям в глобуле белка, что в свою очередь влияет на связывание многих токсических веществ и фармпрепаратов [102]. Показан вклад альбумина в эффект лекарственных взаимодействий: связывание одного лекарства с альбумином влияет на эффективность взаимодействия белка с другими препаратами, а значит, и на их фармакокинетику [163]. При изучении аллостерической модуляции альбумина необходимо учитывать видовые различия, поскольку биохимические эксперименты *in vitro* часто проводят на дешёвом бычьем альбумине, а доклиническое тестирование фармпрепаратов – на представителях отряда грызунов.

Известно, что альбумин обладает связывающей и гидролитической активностью по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС) [95]. ФОС широко используются в сельском хозяйстве и промышленности в качестве пестицидов, пластификаторов, в синтезе лекарственных веществ, полимерных материалов, а также могут применяться в качестве компонентов химического оружия нейротропного действия [98]. Поэтому возможность влиять на взаимодействие СА с ФОС представляет большой интерес с точки зрения фармакокинетики отравляющих веществ.

Таким образом, не вызывает сомнений важность получения информации о механизмах модуляции связывающей и ферментативной активности альбумина. Проблема того, как условия кровеносного русла, различные ксенобиотики и нутрицевтики влияют на функциональные свойства альбумина, является актуальной. Направленное воздействие на СА с помощью модуляторов, влияющих на его связывающую и/или гидролитическую активность, может стать способом

вспомогательной детоксикации ФОС в кровеносном русле, а также решать многие другие задачи в токсикологии или фармакологии.

### **Степень разработанности темы исследования.**

В мировой литературе многие работы посвящены ферментативной активности сывороточного альбумина. Однако большинство исследователей, обсуждая гидролитическую активность белка, подразумевают псевдоэстеразную реакцию в сайте Садлоу II с каталитически активным Tyr411, а экспериментальный факт наличия истинно эстеразной активности у альбумина связывают с медленным деацилированием Tyr411. Лишь в единичных работах говорится об активных центрах, осуществляющих два разных вида активности – истинно- и псевдоэстеразную. Но механизм работы сайта истинно эстеразной реакции не изучен.

Эффекты аллостерической модуляции альбумина активно изучаются. Однако в работах, посвященных этому вопросу, исследуют в основном влияние окисления, связывания жирных кислот или специфических лигандов сайтов Садлоу на взаимодействие альбумина с фармпрепаратами. В научной литературе практически не встречаются работы, посвященные модуляции ферментативных свойств альбумина, и уж тем более практически никто не рассматривал возможность модуляции эстеразных свойств альбумина в контексте влияния на токсикокинетику ФОС. Исследователи, разрабатывающие средства детоксикации ФОС в кровеносном русле, сосредоточены преимущественно на создании рекомбинантных биочистильщиков: параоксоназы для каталитического и бутирилхолинэстеразы для стехиометрического взаимодействия с ФОС [23, 106], однако эти подходы имеют ряд ограничений [1]. Преимущество направленного воздействия на альбумин заключается в следующем: 1) СА – мажорный транспортный белок крови, его концентрация в плазме чрезвычайно высока, 2) молекула СА благодаря мультидоменной структуре легко подвержена аллостерической модуляции, 3) СА может с высокой эффективностью связывать практически все известные ксенобиотики, и влиять на его связывающую и

гидролитическую активность можно недорогими и доступными биоактивными веществами.

Опубликовано немало данных о том, что эффективность связывания различных ксенобиотиков имеет видовые различия и отличается в ряду альбуминов человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА). Однако практически нет информации о том, существует ли разница в механизмах аллостерической модуляции в молекулах СА разных видов. А тем временем, такая информация необходима для правильной экстраполяции данных экспериментов *in vitro* и доклинического тестирования на организм человека. Поэтому вопрос о видовых различиях в модуляции функциональных свойств альбумина требует тщательного изучения. Полученные данные о видовых различиях найдут не только практическое применение, но и позволят получить новую информацию об эволюции альбумина в процессе адаптации видов к изменчивым условиям окружающей среды.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель настоящей работы** – биохимическими, спектроскопическими и вычислительными методами исследовать влияние различных модуляторов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина человека, быка и крысы.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1) С применением технологии протонного ядерно-магнитного резонанса продемонстрировать наличие у молекулы альбумина истинно эстеразной активности на примере взаимодействия с *n*-нитрофенилацетатом (НФА).

2) Биохимическими методами *in vitro* изучить характер влияния различных модуляторов связывающей и гидролитической активности альбумина по отношению к параоксону и НФА.

3) Методами компьютерного моделирования *in silico* определить молекулярные механизмы модуляции связывающей и гидролитической активности альбумина; выявить конкретные функциональные группы внутри молекулы

альбумина (бычьего, крысиного и человеческого), воздействие на которые ведёт к изменению свойств молекулы как целого.

### **Научная новизна**

Представленная работа обладает научной новизной в следующих направлениях паспорта специальности «Биохимия»:

1) *Исследование образования и превращения отдельных молекул, функционирования ферментных систем и надмолекулярных комплексов, проблемы биологического катализа.*

В данной работе с помощью метода ядерно-магнитного резонанса впервые продемонстрировано наличие у сывороточного альбумина истинно эстеразной активности.

2) *Проблемы превращения и обезвреживания ксенобиотиков.*

Впервые в рамках одного исследования с применением биохимических и расчетных методов проведено системное исследование влияния различных модуляторов на связывающую и гидролитическую активность альбуминов разных видов по отношению к сложным эфирам и эфирам фосфорной кислоты.

3) *Выявление в макромолекулах консервативных и функционально-активных участков.*

Установлено, что сайт Садлоу I альбумина в большей степени подвержен аллостерической модуляции по сравнению с сайтом Садлоу II.

4) *Проблемы сравнительной и эволюционной биохимии.*

Впервые показано, что влияние модуляторов на эстеразную активность альбумина имеет видовые особенности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Доказательство существования у сывороточного альбумина эстеразной активности открывает новые возможности для фундаментальных исследований эволюционной роли белка в жизнедеятельности высших животных, и вместе с тем

перспективы использования ферментативных свойств альбумина в фармакологии и токсикологии. В настоящее время существуют десятки лекарственных средств различных фармакологических групп, содержащих в своей структуре сложноэфирную связь (например, анестетики аспирин и бензокаин, противовирусный препарат осельтамивир, антикоагулянт клопидогрел), и еще большее число препаратов находится в стадии разработки и тестирования. Эстеразная активность альбумина может содействовать превращению неактивных пролекарств в активные формы препаратов или, напротив, ускорять превращение активной формы в неактивную.

Знания о веществах, способных модулировать (усиливать/ослаблять) связывающую способность и/или эстеразную активность альбумина могут оказаться основой для разработки новых более безопасных и эффективных препаратов для терапии различных заболеваний или токсических поражений организма. В представленной работе показано, что окисление альбумина ослабляет связывание сложных эфиров с белком. Это дает основание полагать, что воздействие окислителей будет ослаблять связывание фосфорорганических соединений с альбумином и препятствовать доставке молекул отравляющего вещества к нейрональным и нейромышечным синапсам. В результате молекулы ФОС с большей эффективностью будут взаимодействовать с БХЭ плазмы крови и АХЭ эритроцитов, что позволит снизить их токсичность для организма, т.к. меньшее количество молекул ФОС будет взаимодействовать и ингибировать АХЭ нейрональных и нервно-мышечных синапсов. Согласно полученным данным, сайт Садлоу I альбумина гораздо более подвержен аллостерической модуляции по сравнению с сайтом Садлоу II, поэтому препараты, взаимодействующие с сайтом Садлоу I, при разработке и тестировании нуждаются в более тщательной проверке взаимодействия лекарственных средств (drug-drug interaction). Установлено, что характеристики сайтов Садлоу и их подверженность аллостерической модуляции альбуминов крысы и человека ближе между собой по сравнению с альбумином быка, поэтому при разработке и тестировании фармпрепаратов, предназначенных

для человека, в экспериментальных моделях *in vitro* необходимо использовать ЧСА, а не более дешевый и доступный БСА.

### **Методология**

В ходе данной работы был использован широкий спектр методов, включающий в себя: протонный ядерно-магнитный резонанс; определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии альбумина методом спектрофотометрии; определение количества свободных тиоловых групп в альбумине с использованием реактива Элмана; определение потери белка при смене буфера методом Бредфорда; электрофорез белков в полиакриламидном геле; метод молекулярного докинга; метод молекулярной динамики; оценка свободной энергии связывания методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA); статистические методы обработки экспериментальных данных.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту**

- 1) Технологические возможности протонной ЯМР-спектроскопии позволяют обосновать наличие истинно эстеразной активности альбумина, тогда как методология молекулярного моделирования позволяет обосновать участие сайта Садлоу I в эстеразной активности альбумина.
- 2) Изменение редокс-статуса альбумина сопряжено с изменением аффинности к эфирам и влияет на кинетические характеристики (псевдо)эстеразной активности альбумина; характер такого влияния имеет видовые особенности.
- 3) Жирные кислоты оказывают ингибирующий эффект на эстеразную активность альбумина, характер которого имеет видовые особенности.
- 4) Полифенолы оказывают активирующее влияние на скорость гидролиза НФА альбумином в сайте Садлоу I, тогда как влияние на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II незначительно.

5) Компоненты антидотной терапии диазепам и карбоксим оказывают противоположное влияние на кинетические характеристики альбумина по отношению к субстратам.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность данных, полученных в ходе представленного исследования, подтверждается применением современных подходов и методов, хорошей согласованностью и воспроизводимостью результатов. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: XVIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, Рощино, 2017; VI молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 25-27 апреля 2018, Санкт-Петербург; XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Рощино, 2019; VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2020; Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 2021.

### **Личный вклад**

Автор принимала участие во всех экспериментах, описанных в представленной работе, готовила образцы, проводила измерения, снимала показания с приборов, обрабатывала данные, выполняла вычислительные эксперименты, презентовала результаты исследований в научном сообществе (стендовые и устные доклады на конференциях и молодежных школах), участвовала в написании статей. Ряд экспериментов проведен при участии сотрудников Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, а также сотрудников Ресурсного Центра Санкт-Петербургского Государственного университета «Магнитно-резонансные методы исследования». Работы были поддержаны грантами РФФИ. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных Высшей

аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, и 5 статей в журналах, входящих в базу Web of Science.

### **Финансовая поддержка работы**

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-015-00304 и № 19-34-90026.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Эволюционные, генетические и структурные особенности альбумина**

Сывороточный альбумин является основным белком крови млекопитающих, его концентрация в плазме колеблется в пределах 500-700 мкМ. Синтез альбумина осуществляется в печени. Среднее количество синтезируемого в организме белка составляет 0.7 мг в час (порядка 10-15 мг в сутки). Среднее время жизни одной молекулы ЧСА – 19-20 дней [120]. Углеводной оболочки молекула СА не имеет, потому легко связывает самые разные низкомолекулярные лиганды, катионы металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Au}^+$ ), молекулы воды, ЖК и жирорастворимые вещества, органические соединения, которые принимают участие в обмене веществ (оксид азота, билирубин, соли желчных кислот), а также многие фармпрепараты: нестероидные противовоспалительные препараты (фенилбутазон, ибупрофен), антикоагулянты (аспирин, варфарин), противоэпилептические, гиполипидемические средства и многие другие ксенобиотики [45, 54, 125]. Альбумин осуществляет транспорт связываемых веществ к тканям-мишеням и в значительной мере оказывает влияние на фармакокинетику препаратов, токсикокинетику природных и синтетических ядов, скорость обмена веществ.

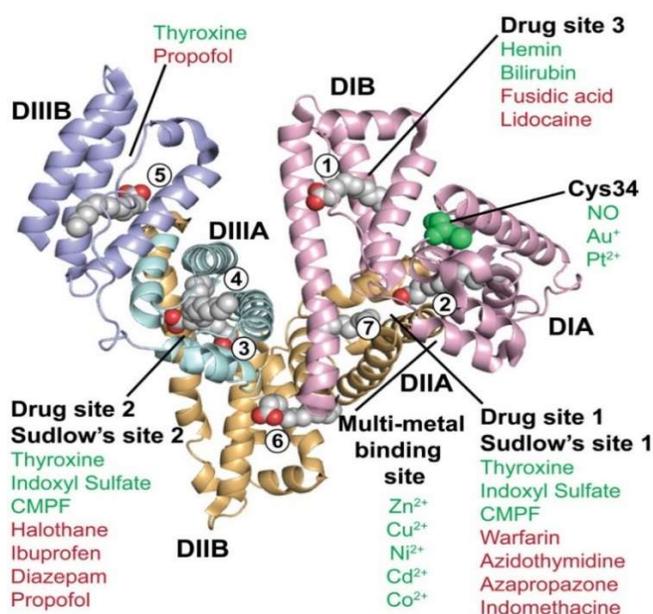
Сывороточный альбумин начал привлекать внимание исследователей ещё в конце 19-го века [103]. Начиная с 50-х годов прошлого века число научных статей,

посвященных альбумину, неуклонно растет, к 1970 году публиковалось в среднем более тысячи работ в год. В настоящее время число публикаций, так или иначе касающихся свойств сывороточного альбумина исчисляется десятками тысяч. Однако, только в 1990-х годах была получена трёхмерная структура ЧСА в высоком разрешении. [73, 145]. Трёхмерная структура бычьего БСА была получена экспериментально в 2012 г. [34], а рентгеноструктурный анализ КСА, основного объекта фармакологических и токсикологических экспериментов *in vivo*, ещё не проведен. Молекула альбумина состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 585 аминокислотных остатков (в случае ЧСА), 584 (в случае КСА) или 583 (в случае БСА) [104, 142, 156].

СА является одним из наиболее эволюционно изменчивых белков: у разных видов гомология аминокислотной последовательности может быть ниже 30%. Сравнение первичных структур альбуминов человека, быка и крысы показало, что аминокислотные последовательности ЧСА и БСА сходны между собой на 75.6%, ЧСА и КСА на 73.0%, а меньше всего процентов гомологии у КСА и БСА – только 69.9%. Логично предположить, что эволюционная изменчивость белка связана с необходимостью «развивать» связывающие характеристики по отношению к новым лигандам – гормонам, метаболитам, токсинам. Однако, несмотря на высокую изменчивость альбумина, он обладает тремя консервативными характеристиками. Первая из них – это вторичная структура белка, которая состоит преимущественно из альфа-спиралей при полном отсутствии бета-листов. Вторая консервативная особенность – это третичная структура альбумина, которая включает в себя 3 гомологичных домена, DI, DII и DIII. Предковый ген СА претерпел утроение в процессе эволюции около 525 млн лет назад [72], когда впервые появились позвоночные. В свою очередь, каждый из этих доменов состоит из двух субдоменов, А и В, состоящих из 6 и 4 спиралей, соответственно. Интересное исключение составляет минога, одно из так называемых «живых ископаемых», у которой альбумин состоит из семи доменов [65]. Третья особенность, характерная для альбуминов всех видов, – это паттерн дисульфидных

связей. Внутри молекулы альбумина содержится 17 дисульфидных мостиков, а один остаток цистеина (Cys34) имеет свободную тиоловую SH-группу, которая является сайтом взаимодействия альбумина с редокс-соединениями [34, 62].

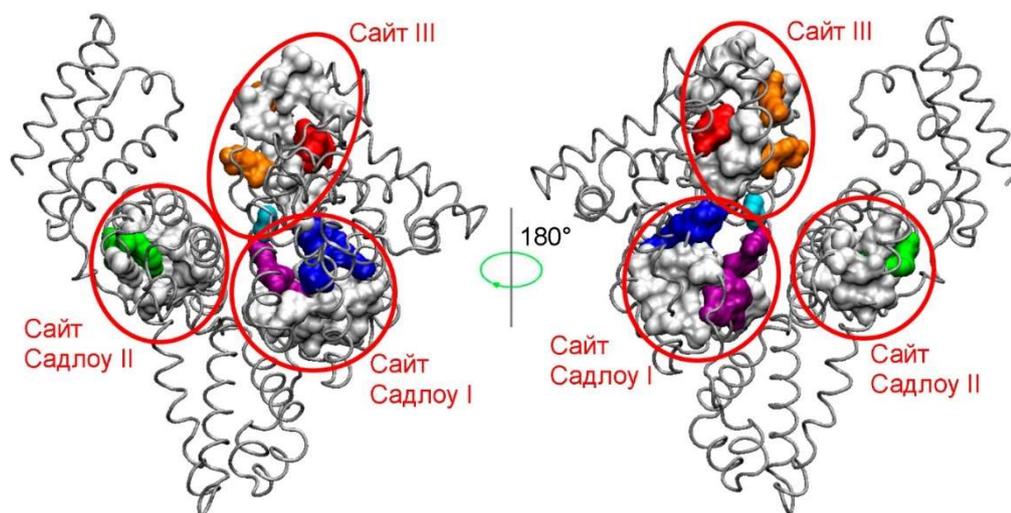
В молекуле альбумина имеется три первичных сайта связывания эндогенных и экзогенных лигандов: Садлоу I, Садлоу II [144] и сайт III [167], а также несколько вторичных – их количество определяется свойствами связываемых веществ и конформацией молекулы альбумина (рисунок 1.1). Также на поверхности белка есть семь сайтов связывания ЖК (FA1-7) и метал-связывающий центр (рисунок 1.1).



**Рисунок 1.1** – Трёхмерная структура альбумина человека с обозначением сайтов связывания эндогенных и экзогенных веществ [138].

На рисунке 1.2 более детально представлены особенности лиганд-связывающих сайтов альбумина. Сайт Садлоу I представляет собой гибкую многокамерную полость. Он образован шестью  $\alpha$ -спиралями субдомена IIА и фрагментом «поворот-спираль» субдомена IB (аминокислотные остатки 148-154). Сайт включает в себя центральную зону, связанную с тремя дополнительными полостями (одна из которых совпадает с сайтом связывания ЖК FA7). Внутренняя часть сайта Садлоу I в основном неполярна, но содержит два полярных участка:

первый (Tyr150, His242, Arg257, отмечено синим на рисунке 1.2) находится у основания сайта, а другой (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222, отмечено фиолетовым на рисунке 1.2) – у входа в него. В Садлоу I связываются в основном объемные гетероциклические соединения с отрицательным, часто делокализованным на неполярном каркасе зарядом. Классический лиганд сайта Садлоу I – варфарин.



**Рисунок 1.2** – Лиганд-связывающие сайты альбумина. Неполярные аминокислоты сайтов отмечены белыми сферами, полярные – цветными сферами.

Сайт Садлоу II локализован в субдомене IIIA. Согласно данным рентгеноструктурного анализа (РСА), сайт Садлоу II ЧСА представляет собой обширный неполярный «карман» (пересекающийся с сайтами связывания ЖК FA3 и FA4) с единственным полярным участком (Tyr411 и Arg410), расположенным у входа в сайт (отмечено зеленым на рисунке 1.2). Лиганды сайта Садлоу II обычно содержат периферический отрицательный заряд, как, например, ибупрофен.

Третий лекарственный центр в субдомене IV (сайт III) недавно был идентифицирован как первичный сайт связывания билирубина, гемина и сульфонида. Сайт III включает в себя два полярных участка. Первый, расположенный у входа в сайт, состоит из аминокислот Tyr138 и Tyr161 (отмечено красным на рисунке 1.2). Второй участок в основании сайта включает в себя Arg117

и Arg186 (отмечено оранжевым на рисунке 1.2). Полярный Ser193 (отмечено голубым на рисунке 1.2) является условной границей между сайтами I и III.

Трехмерная структура альбумина обладает достаточно высокой конформационной лабильностью, и в случае связывания различных лигандов в его молекуле могут возникать характерные для мультимерных белков явления кооперативности и аллостерической модуляции [20]. Литературные данные о влиянии связывания одних лигандов альбумина на его взаимодействие с другими лигандами более подробно представлены в разделе 1.4.

## **1.2. Эстеразная и псевдоэстеразная активность альбумина**

Сывороточный альбумин способен не только эффективно транспортировать вещества к местам их биологической трансформации, но и принимать непосредственное участие в фармако- и токсикокинетике многих соединений, например, сложных эфиров. Взаимодействие со сложными эфирами имеет большое значение в контексте данной работы. Наличие у альбумина эстеразной и псевдоэстеразной активности по отношению НФА, модельному соединению, задействованному во многих исследованиях, описанных ниже, а также по отношению к  $\alpha$ -нафтилацетату было неоднократно подтверждено экспериментально [34, 108, 150]. Также альбумин обладает эстеразной и псевдоэстеразной активностью по отношению к эфирам жирных кислот [151], нестероидным противовоспалительным средствам (аспирину) [127], метаболитам лекарственных препаратов (глюкурониду кетопрофена) [49], эфирам никотиновой кислоты [136], противоопухолевым препаратам (циклофосфамиду) [93], некоторым гормонам [46].

Одним из типов псевдоэстеразной реакции с участием альбумина является ацетилирование. Сложноэфирный субстрат в процессе этой реакции (так называемой реакции псевдопервого порядка) полностью не гидролизует, а образует ковалентные аддукты с альбумином сразу в нескольких активных центрах молекулы СА. Показано, что при взаимодействии с НФА альбумин может быть

ацетилирован по 82 аминокислотным остаткам, из которых 59 – это Lys, 10 – Ser, 8 – Thr, 4 – Tyr и 1 – Asp [99]. НФА обладает наибольшим сродством к тирозину Tyr411, представляющему собой каталитический центр сайта Садлоу II, однако образующийся в ходе этой реакции аддукт менее стабилен, чем аддукты с остатками Lys.

С точки зрения наличия у альбумина эстеразной и псевдоэстеразной активности интересным является его взаимодействие с ФОС. Было показано наличие у альбумина (псевдо)эстеразной активности по отношению к параоксону [105, 112], зарину, зоману, [31], циклозарину и V-газам [83, 161]. Известно, что они образуют ковалентные аддукты с аминокислотными остатками Tyr411 и Tyr150 [83, 95], являющимися активными центрами сайтов Садлоу II и Садлоу I, соответственно.

Следует отметить, что основными ферментами, участвующими в детоксикации ФОС в кровеносном русле, являются фосфотриэстеразы, к которым относится параоксоназа-1 (PON-1), а также карбоксилэстеразы (КЭ). В отличие от грызунов, в крови человека содержание КЭ крайне мало, и, по всей видимости, функции этого фермента выполняет альбумин. По этим причинам НФА (классический субстрат для изучения КЭ), и параоксон (один из субстратов PON-1) применяются для изучения эстеразной активности альбумина.

### **1.3. Кинетика ферментативных реакций с участием альбумина**

Существует два способа снижения энергии активации в ходе ферментативной реакции [143]: 1) под действием фермента снижается свободная энергия переходного состояния посредством фиксации его пространственных координат; 2) фермент меняет цепочку последовательных превращений от субстрата к конечному продукту, допустим, добавляя одну или несколько дополнительных стадий реакции. Предположительно, альбумин способен влиять на ход реакций гидролиза эфиров как первым, так и вторым способом. Но даже в случае хода реакции только по второму пути, он может считаться полноценным ферментом. Классическое

описание трехстадийной ферментативной реакции, в ходе которой происходит образование ковалентного аддукта на промежуточной стадии реакции давно вошло в учебные пособия по энзимологии (взять, к примеру, учебник 1982 года «Ферменты» Диксона и Уэбба).

Реакция гидролиза эфира (в нашем случае НФА) под действием альбумина (в качестве катализирующего фермента) является классической реакцией гидролиза – это было показано ещё в 1959 году [37]. При рассмотрении кинетики этой реакции выяснили, что *n*-нитрофенол и ацетатная группа, являющиеся продуктами данной реакции, накапливаются в отношении примерно 1:1, а когда гидролиз определенного количества НФА происходит полностью, ферментативные свойства альбумина не уменьшаются, и при добавлении новой порции НФА оставшиеся в реакционной смеси молекулы белка продолжают «работать», гидролизуя новые молекулы субстрата. В этом же исследовании было установлено, что кинетика взаимодействия НФА с СА соответствует кинетике Михаэлиса-Ментен [109]. В процессе реакции образуется промежуточный комплекс белка с *n*-нитрофенил-*N*-метилкарбаматом. Кажущаяся константа диссоциации этого комплекса составляет  $1.4 \times 10^{-4}$  М, что в целом соответствует величине  $K_s$  для эстераз [37].

Однако ни в работе [37], ни в других публикациях того времени, посвященных альбумину, не акцентировалось внимание на том, что в молекуле белка существует два различных активных центра, каждый из которых отвечает за «свой» вид активности: первый сайт – за истинно эстеразную, другой – за псевдоэстеразную. Первая публикация, где это было показано, увидела свет в 1972 году [150].

Однозначного ответа на вопрос, считать ли альбумин эстеразой, до настоящего времени не существует. В среде учёных биохимиков проблемы, связанной с идентификацией и классификацией эстераз, многократно выносились на обсуждение [84, 159]. Как ферментная группа, эстеразы обладают достаточной обширной субстратной специфичностью. В то же время, эстеразная реакция может быть катализована и ферментом, относящимся к другому классу ферментов. К

примеру, альбумин, согласно общепринятой классификации, вообще не относится к ферментам, но способен, как обсуждалось выше, катализировать реакцию гидролиза НФА.

В ходе разработки классификации для ферментов неизбежно возникает вопрос о необходимой минимальной скорости, с которой фермент должен быть способен гидролизовать субстрат для того, чтобы считаться «классической» эстеразой. Скажем,  $\alpha$ -химотрипсин или альдегиддегидрогеназа способны гидролизовать НФА с числом оборотов  $k_{cat}$  равным 0.9 или 54 соответственно, в свою очередь карбоксилэстераза печени гидролизует тот же субстрат со значением константы более 40 тысяч оборотов [84]. Кроме этого, каждая эстераза «работает» наиболее эффективно со «своим», характерным для неё субстратом. Принимая эти факты во внимание, был сделан вывод, что наиболее рационально причислять к истинным эстеразам такой фермент, активность которого составляет более тысячи оборотов по отношению хотя бы к одному из существующих субстратов. Однако, официально данный критерий так и не был утверждён [159].

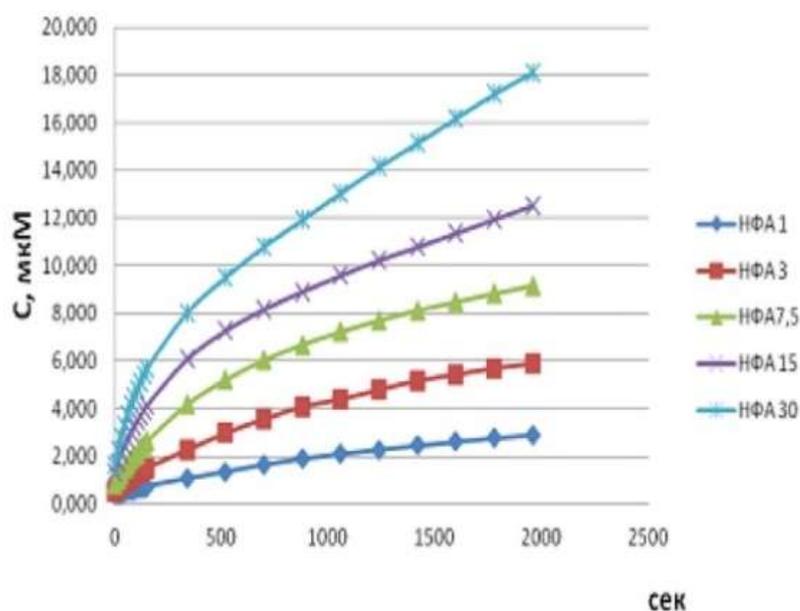
Здесь необходимо упомянуть границы, в которых можно применять классическую кинетику Михаэлиса-Ментен и Бриггса-Холдейна [32, 109]. Мы можем говорить, что они имеют место в случае, когда соблюдаются все из перечисленных ниже условий:

- 1) субстрат присутствует в избытке
- 2) реакция является стационарной, т.е.  $d(ES)/dt=0$
- 3)  $k_{cat} \ll k_{-1}$  и  $k_{cat} \leq k_{+1}$ , т.е. время достижения равновесного состояния пренебрежимо мало.

Случаи, когда  $k_{cat} \gg k_{-1}$  и/или  $k_{+1}$ , или когда количество свободного субстрата после установления равновесия неизвестно, не могут рассматриваться в рамках классической кинетики. Такие ситуации часто возникают при исследовании высокоактивных ферментов. Для их адекватного описания могут быть применены модели Моррисона или ван Слайка-Каллена [56, 91, 111]. Что интересно, взаимодействие сывороточного альбумина, скажем, с НФА, полностью

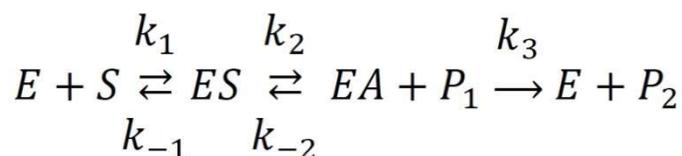
укладывается в классическое описание ферментативной кинетики, и это, несомненно, даёт альбумину полное право встать в один ряд с другими ферментами.

Большинство исследователей связывает наличие истинно эстеразной активности у альбумина с медленным деацилированием Тур411 [1, 4]. Взаимодействие СА с НФА имеет две фазы: в течение нескольких первых минут наблюдается "всплеск" активности, т.е. происходит быстрый выход продукта реакции нитрофенола, после чего система переходит в стационарный режим, но не выходит на плато (рисунок 1.3).



**Рисунок 1.3** – Кинетика выхода нитрофенола в процессе взаимодействия различных концентраций НФА альбумином [12].

В 2015 была предложена следующая схема для описания взаимодействия альбумина с НФА (Схема 1):



**Схема 1** – Взаимодействие между альбумином и *n*-нитрофенилацетатом. S – субстрат, P<sub>1</sub> – *n*-нитрофенол, P<sub>2</sub> – ацильная группа [4].

Данной схемой может быть описана работа каждого из сайтов Садлоу: на первом этапе взаимодействия субстрат связывается с сайтом с образованием фермент-субстратного комплекса ES, затем происходит высвобождение продукта *n*-нитрофенола ( $P_1$ ) и ацетилирование фермента (EA), и на последнем этапе происходит деацетилирование альбумина и высвобождение ацетата ( $P_2$ ). Принципиальное отличие между псевдоэстеразной и истинно эстеразной активностью состоит лишь во времени жизни ацетилированного фермента EA, т.е. основная разница в наблюдаемой кинетике выхода продукта обусловлена константой  $k_3$ , характеризующей реакцию деацетилирования. Время полужизни ацетилированного Tyr411, отвечающего за псевдоэстеразную активность, составляет  $61 \pm 4$  часа [99], а в случае истинно эстеразного катализа комплекс EA – это, по всей видимости, короткоживущий тетраэдрический интермедиат (комплекс), аналогичный тому, который образуется в процессе гидролиза ацетилхолина ацетилхолинэстеразой [166].

Более того, если пренебречь коротким временем жизни ацетилированного сайта истинно эстеразной активности и пренебречь незначительной скоростью деацетилирования Tyr411, то с помощью предложенной схемы можно описать всю гидролитическую активность альбумина в двух сайтах. На первом этапе взаимодействия альбумина с субстратом происходит его адсорбция в сайте Садлоу II (ES), быстрое высвобождение продукта *n*-нитрофенола ( $P_1$ ), отмечаемое как «всплеск» активности, и ацетилирование тирозина Tyr411 (EA). На втором этапе субстрат связывается с сайтом эстеразной активности альбумина, где происходит его гидролиз до ацетата ( $P_2$ ) и *n*-нитрофенола ( $P_1$ ).

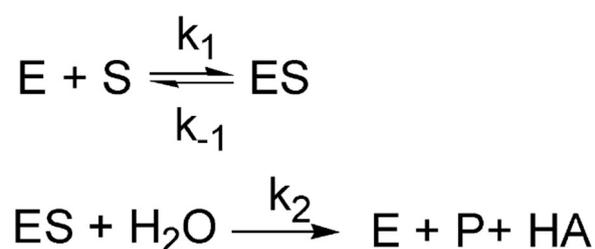
Здесь необходимо отметить, что определенный вклад в «кажущуюся» кинетику обоих сайтов альбумина вносит т.н. элиминация Кемпа – прототипная реакция отщепления протона от углерода, которая, вероятно, имеет место вблизи других сайтов, количество которых может исчисляться десятками. Реакция происходит в слое Штерна, на границе раздела между головкой мицеллы или поверхностью белка и водой, так что значительное ускорение реакции может быть

достигнуто независимо от пространственного расположения субстрата [133, 137]. Известно, что скорость реакции снижается в протонных растворителях, таких как вода, по сравнению с апротонными органическими растворителями; электростатическая составляющая водородных связей является основным фактором ингибирующего действия воды, тогда как внешнее электрическое поле, ориентированное в направлении переноса заряда, увеличивает скорость реакции [14]. С другой стороны, механизм элиминации Кемпа в белковых молекулах связан с присутствием остатков ароматических аминокислот (Trp, Tyr, Phe), обеспечивающих стэкинг-взаимодействие с донорами водородной связи (Lys, Arg, Ser, Tyr, His, молекула воды) [132]. Ранее было предложено объяснение опосредованного альбумином гидролиза некоторых субстратов существованием каталитических диад (в отличие от каталитических триад в холинэстеразах) His-Tyr или Lys-Tyr, в которых остатки гистидина или лизина функционируют как кислотные остатки и доноры протона, а остаток тирозина является каталитическим основанием [4]. Создание всеобъемлющей математической модели для описания (псевдо)эстеразной активности альбумина, которая бы учитывала все типы взаимодействия во всех возможных сайтах с учетом элиминации Кэмпса, представляет собой весьма нетривиальную задачу, решение которой выходит далеко за рамки настоящей работы.

Конечно, нельзя не принимать во внимание, что гидролиз под действием альбумина протекает довольно медленно, особенно в случае ФОС. Однако, не будем забывать: сыворотка крови человека не содержит карбоксилэстераз, которые гидролизуют ФОС с гораздо большей скоростью [96], а количество PON1 (являющегося основным ферментом, участвующим в каталитической детоксикации ФОС в кровяном потоке) в плазме крови человека на 3 порядка меньше по сравнению с альбумином. В частности, поэтому параоксоназа не может быть основным средством детоксикации ФОС при токсикологически релевантных дозах и концентрациях. Количество СА в плазме крови позволяет ему сравниться по эффективности взаимодействия с PON1, так как из-за равновесного характера

взаимодействия альбумина с субстратами ( $k_{-1} \gg k_{+2}$ ) [21] и его значительного количества в плазме, кажущаяся скорость образования фермент-субстратного комплекса оказывается физиологически значимой, и именно этот факт имеет определяющее значение в наших исследованиях.

Основными причинами того, почему реакция гидролиза альбумином сложноэфирных соединений происходит достаточно медленно, являются отсутствие у молекулы альбумина оксианионного центра и каталитической триады [134]. Каталитические триады распространены среди гидролаз и трансфераз, осуществляющих ковалентный катализ. Главная отличительная черта такого катализа – образование промежуточного ковалентного аддукта, причём восстановление фермента впоследствии происходит за счёт разрыва этой самой ковалентной связи [35, 48]. В большинстве случаев реакция образования промежуточного продукта – это ацилирование. При ацилировании образуются две структуры в форме тетраэдров, вторая структура образуется с участием молекулы воды при переходе радикала (в данном случае ацильного) с серинового остатка на эту молекулу [134]. Рассмотрим с этой точки зрения расщепление ацетилхолинэстеразой ацетилхолина. Это процесс является достаточно быстрым ( $k_{cat}/K_M = 1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [143]), и для его описания подходит приведенная ниже схема (Схема 2):



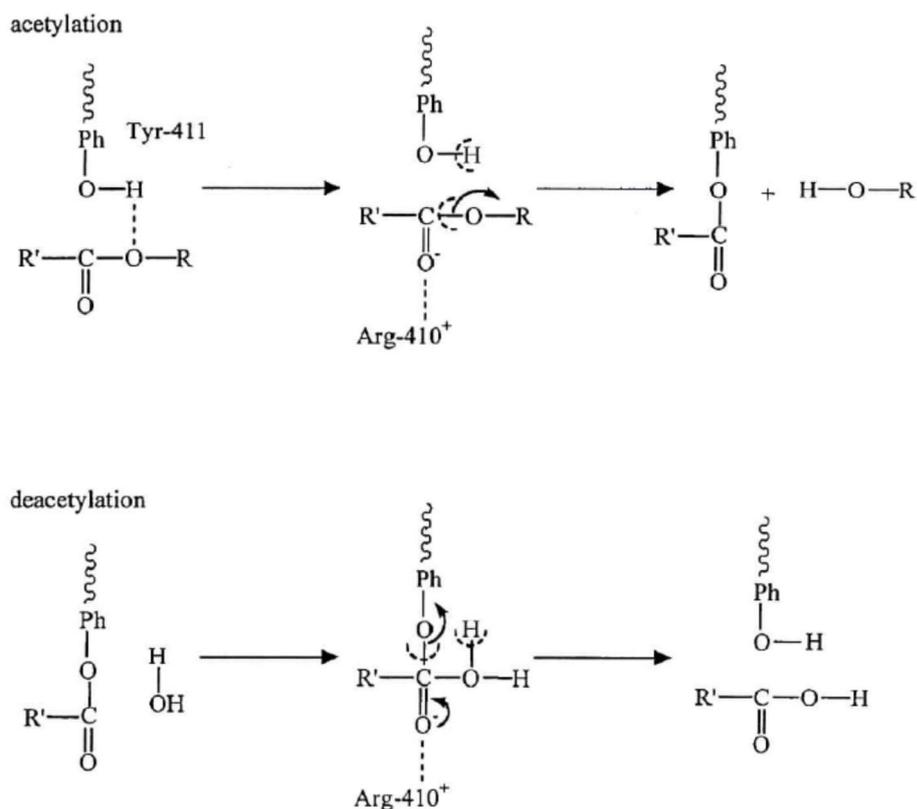
**Схема 2** – Взаимодействие ацетилхолина с ацетилхолинэстеразой [165].

При ацилировании происходит образование стабильного тетраэдрического комплекса. Во время нуклеофильной атаки атома кислорода каталитического серина Ser203 ацетилхолинэстеразы на карбонильный атом ацетилхолина гистидин

каталитической триады His447 протонируется. Протонированная форма гистидина стабилизируется за счет взаимодействия третьей аминокислотой каталитической триады – Glu334. В итоге в процессе ацилирования образуется тетраэдрический комплекс, стабилизированный водородными связями между субстратом и аминокислотами оксианионного центра (Gly121, Gly122, Ala204); этот комплекс под действием протонированного His447, играющего роль окислителя, распадается до ацилфермента, при этом выделяется холин [166]. Эта схема была известна давно, и с самых первых публикаций на себя обратил внимание механизм ингибирования стадии деацетилирования, т.е. образование ковалентного аддукта в промежуточной стадии реакции [76]. Аналогичную стадию проходит и фермент субстратный комплекс альбумина с НФА, вопрос только во времени существования ковалентной связи, это время существенно различается у разных ферментов, субстратов, при разных внешних условиях, рН, температуре.

Конечно, в отличие от молекулы АХЭ, молекула альбумина не имеет ни каталитической триады, ни оксианионного центра, но некоторые авторы подчёркивают важность гуанидинового остатка Arg410 для гидролитической активности сайта Tyr411; предположительно, Arg410 заменяет в молекуле альбумина оксианионный центр, посредством образования водородной связи с карбонильной группой на молекуле субстрата (рисунок 1.4) [134]. В то же время, Arg410 не принимает участие в нековалентном связывании диазепама [160].

Показано, что в истинно эстеразной активности альбумина по отношению к *n*-нитрофенил 4-гуанидинобензоату принимает участие остаток гистидина [90]. К такому выводу авторы работы [90] пришли, проведя анализ рН-профиля константы  $k_2$ , который показал, что в реакции задействованы ионизируемые каталитические группы с  $pK_a$  около 6 и 10 (что соответствует гистидину и тирозину, соответственно). Полученный результат говорит о том, что имидазольное кольцо гистидина и гидроксильная группа тирозина ионизированы. Боковой радикал гистидина в процессе гидролиза работает как катализатор.



**Рисунок 1.4** – Механизм гидролиза сложных эфиров альбумином в сайте Садлоу II с каталитически активным Tyr411 [134].

Высказано предположение, что для осуществления истинно эстеразного гидролиза по отношению к некоторым сложным эфирам альбумину нужна каталитическая «диада» His-Tyr или Lys-Tyr, в которой гистидин или лизин играет роль кислотного остатка. В литературе встречаются похожие примеры, лишь только с тем отличием, что два гистидина работают как основной и кислотный остатки [52]. Опираясь на эти данные и ряд других литературных источников, можно сделать вывод, что сайты Садлоу являются основными сайтами взаимодействия альбумина с НФА и ФОС, в том числе высокотоксичными. При этом ранее было установлено, что сайт Садлоу II с каталитически активным Tyr411 ответственен за псевдоэстеразную активность белка [95]. Ранее сотрудниками ИЭФБ РАН было высказано предположение, что сайт Садлоу I с каталитическими Tyr150 благодаря тому, что в ближайшем окружении этого тирозина есть аминокислотный остаток гистидина His242, по всей видимости, отвечает за истинно эстеразную активность

альбумина [2]. Это разделение не является строгим: возможно, ковалентный аддукт образуется на промежуточной стадии реакции и в том, и в другом случае – отличаются только времена существования данного аддукта, то есть константы  $k_3$ , которые характеризуют скорость реакции деацетилирования в каждом из сайтов.

#### **1.4. Модуляция связывающей и ферментативной активности альбумина**

##### *1.4.1. Аллостерические эффекты в молекуле альбумина*

Для молекулы альбумина характерна аллостерическая модуляция – взаимодействие лиганда с одним из сайтов влияет на эффективность связывания и/или скорость гидролиза субстрата в другом сайте [20]. Имеются данные о том, что в молекуле альбумина происходят конформационные изменения после связывания некоторых эндогенных соединений, переносимых по кровеносному руслу, таких как мочевины [154], билирубин [81], эстрадиол [42]. Взаимодействие альбумина с глюкозой приводит к изменению конформации белка и влияет на его связывающие свойства [25, 125]. Связывание ЖК, ионов металлов, различных ксенобиотиков, а также патологические состояния и старение организма тоже могут способствовать появлению аллостерических эффектов в альбумине [45].

Направленное воздействие на альбумин с помощью молекул, модулирующих его связывающие и/или эстеразные свойства, может стать дополнительным способом детоксикации ФОС в кровеносном русле, а также решать многие другие задачи в токсикологии или фармакологии [4, 63].

Основные преимущества направленного воздействия на альбумин для усиления терапии отравления ФОС следующие: 1) альбумин является мажорным транспортным белком крови и его концентрация в плазме крайне высока, 2) благодаря мультидоменной структуре молекула альбумина легко подвержена аллостерической модуляции, 3) СА может с высокой эффективностью связывать практически все известные ксенобиотики, и влияние на его связывающую и гидролитическую активность можно недорогими и доступными биоактивными веществами. Проблема в том, что как образование ковалентного аддукта с ФОС,

так и каталитическое расщепление ФОС происходят медленно, поэтому альбумин является в первую очередь "транспортным средством" для доставки ФОС к сайтам с высокой аффинностью (холинэстеразы). Необходимо либо ускорить образование ковалентного аддукта в сайте Садлоу II, либо усилить связывание альбумина с ФОС и ускорить гидролиз в сайте Садлоу I, либо, наоборот, не допустить "посадку пассажира в транспортное средство", и тогда ФОС ("пассажир альбумина") быстрее найдет и необратимо свяжется с холинэстеразами кровеносного русла, что лучше, чем такое же связывание за пределами кровеносного русла - с АХЭ нервно-мышечных и нейрональных синапсов.

#### *1.4.2. Модуляция активности альбумина жирными кислотами*

Веществами, которые с наибольшей вероятностью могут влиять на эстеразную/псевдоэстеразную активность альбумина, являются мажорные жирные кислоты: олеиновая (ОК), пальмитиновая (ПК), стеариновая и линолевая. Концентрация каждой из них может составлять десятки мкМ [50]. Альбумин является основным транспортным белком для переноса ЖК по сосудистому руслу. Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) было показано, что в молекуле альбумина существует семь сайтов связывания ЖК: FA1 (возле Ala158), FA2 (возле Leu22), FA3 (возле Asn391), FA4 (возле Tyr411), FA5 (возле Ala528), FA6 (возле Ala213), FA7 (возле Tyr150) [157]. Окружение сайта FA4 соответствует сайту Садлоу II, а сайта FA7 - сайту Садлоу I. Согласно литературным данным, олеиновая кислота обладает максимальным сродством к сайту FA5, и чуть меньшим сродством к сайту FA2 [129]. Установлено, что при взаимодействии с ЖК в растворе альбумин человека пластичен и гибок [128]. Во многих работах показано, что связывание альбумина с ЖК оказывает влияние на сродство белка к другим различным лигандам [44, 147, 158]. Взаимодействие с основными лекарственными сайтами Садлоу I и Садлоу II варфарина и диазепама в присутствии жирных кислот было изучено методами сканирующей калориметрии, показана зависимость активности белка в отношении этих лигандов в зависимости от концентрации олеиновой кислоты [69]. Не следует исключать и влияние связывания ЖК с СА на

эффективность его взаимодействия с органофосфатами. Оценка влияния ЖК на связывающие и ферментативные свойства альбумина – задача не только интересная, но и необходимая. В представленной работе в экспериментах *in vitro* и *in silico* мы изучили влияние ОК и ПК на взаимодействие альбумина с НФА и параоксоном.

#### *1.4.3. Модуляция активности альбумина полифенолами*

В поисках вспомогательных средств терапии отравлений в последнее время стали уделять внимание нутрицевтикам [38], преимущество которых заключается в дешевизне, доступности, а самое главное – довольно высокой эффективности по отношению к оставленным последствиям отравлений при практически полном отсутствии побочных эффектов. Наибольший интерес представляют полифенолы – класс химических соединений, имеющих более чем одну фенольную группу на молекулу и содержащихся во многих пищевых продуктах растительного происхождения. В ряде экспериментов *in vivo* на грызунах было показано протекторное влияние полифенолов при отравлении ФОС [5, 113, 123, 162]. Полифенолы способны связываться с альбумином [94] и влиять на взаимодействие белка с другими соединениями. Показано, что дубильная кислота является эффективным модулятором связывающей и эстеразной активности сывороточного альбумина у млекопитающих [78]. В представленной работе впервые биохимическими и расчетными методами исследовано влияние полифенолов на связывающую и гидролитическую активность альбумина по отношению к НФА и параоксону.

#### *1.4.4. Модуляция активности альбумина редокс-соединениями*

В молекуле альбумина содержится свободная тиоловая группа в составе цистеина Cys34, которая может образовывать дисульфиды со свободным цистеином и другими тиолами, а также окисляться до сульфеновой или сульфиновой кислоты [66]. В плазме крови здорового человека около 80% всех тиолов приходится именно на СА [153]. Альбумин, содержащий свободную сульфгидрильную группу в составе Cys34, называется меркаптоальбумином, а

альбумин, модифицированный по остатку Cys34, – немеркаптоальбумином. Cys34 играет главную роль во взаимодействии альбумина с редокс-соединениями [79, 130]. Окисление Cys34 до сульфеновой кислоты (CSA-SOH) позволяет альбумину инактивировать стехиометрически пероксид водорода, пероксинитрит, супероксид-анион и хлорноватистую кислоту [124]. У здоровых людей около 70% альбумина находится в восстановленном состоянии [47]. При патологических состояниях, сопровождающихся оксидативным стрессом, уровень окисленного альбумина может возрасти до 70% [114]. Недавние исследования указывают на то, что окисленный СА является самостоятельным патогенетическим фактором ряда часто встречаемых социально-значимых заболеваний, а их уровень тесно связан с тем, какого питания придерживается человек [148]. Известно о повышении процентного содержания окисленного альбумина при таких заболеваниях как гиперпаратиреоз [116], острый ишемический инсульт [126], болезнь Паркинсона [155], болезнь Альцгеймера [40], миодистрофия Дюшенна [67] и др.

Окисление тиоловой группы приводит к конформационным изменениям в молекула альбумина и влияет на эффективность его взаимодействия с фармпрепаратами и токсическими веществами [102]. Сродство к эндогенным лигандам триптофану и билирубину, к лекарствам диазепаму и варфарину уменьшается пропорционально процентному содержанию окисленного альбумина [45, 114]. Сродство к молекулам липидов также меняется: проатеросклеротические лизофосфатидилхолин и лизофосфатидная кислота более эффективно взаимодействуют с окисленной изоформой, тогда как антиатеросклеротические производные эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот обладают более высокой аффинностью к восстановленной изоформе СА [89].

В целом, влияние окисления альбумина на его связывающие и эстеразные свойства практически не изучалось, а в работах, посвященных этому вопросу, получены противоречивые данные. В представленной работе впервые с применением биохимических и вычислительных методов проведено комплексное исследование влияния степени окисления Cys34 на взаимодействие альбумина с

НФА и параоксоном и изучены межвидовые различия в механизме аллостерической модуляции белка редокс-соединениями.

### **1.5. Видовые различия в структурных и функциональных характеристиках альбумина**

Сравнение первичных структур трёх белков ЧСА, КСА и БСА посредством программы Clustal Omega [139] показало, что молекулы ЧСА и БСА сходны между собой на 75,6%, а ЧСА и КСА на 73,0%, меньше всего процентов сходства у КСА и БСА – только 69,9%. В случае прицельного рассмотрения последовательностей аминокислотных остатков, находящихся внутри сайта Садлоу I, молекулы ЧСА и КСА оказываются наиболее похожими друг на друга, у них 75% идентичности, при этом у БСА обнаруживается только 57% сходства и с КСА, и с ЧСА. Отметим, что сайт Садлоу II у сывороточного альбумина всех трёх видов млекопитающих является консервативным. Было обнаружено также, что в сайте Садлоу I молекулы БСА многие лизиновые остатки заменены аргининовыми (Lys195→Arg195, Lys199→Arg199), это оказывает влияние на объем сайта и на его пространственную конфигурацию, вследствие большей разветвленности аргининовых цепей по сравнению с лизиновыми.

Исследования связывания лекарственных агентов с альбуминами различных видов млекопитающих важны для оценки надежности экстраполяции данных клинических тестирований. Опубликованы данные о том, что сродство различных ксенобиотиков к альбумину различно для БСА и ЧСА. Так, установлено, что ЧСА эффективнее связывает 2-антроцен-карбоксильную кислоту и капрофен по сравнению с БСА [86]. В работе [19] приведены данные, что декстран голубой взаимодействует с ЧСА, но не с БСА. Авторы исследования [33] установили, что варфарин эффективнее связывается с БСА, чем с ЧСА, а его аценокумарол, схожий по структуре, но содержащий дополнительную NO<sub>2</sub> группу, наоборот, эффективнее взаимодействует с ЧСА. Полифенолы куркумин и диацетилкуркумин намного менее эффективно связываются с ЧСА, чем с БСА [110]. Показано, что

пиридоксальфосфат взаимодействует в 10 раз более эффективно с ЧСА, чем с БСА [57], а метилпаратрион в полтора раза хуже взаимодействует с БСА, чем с ЧСА [140]. В некоторых исследованиях показано, что ЧСА и КСА имеют близкие константы связывания биологически активных соединений [64, 71]. Однако также опубликованы данные, свидетельствующие и о том, что эффективность взаимодействия некоторых экзогенных соединений различается для ЧСА и КСА [22, 58]. Установлено, что связывание диазепама, фенилбутазона, кетопрофена, билирубина с ЧСА значительно отличалось от связывания с другими альбуминами с точки зрения аффинности и конформации связанных лигандов. Фенилбутазон, лиганд сайта Садлоу I на ЧСА, проявлял более высокую аффинность к связыванию с БСА по сравнению с КСА и ЧСА. В случае диазепама, лиганда сайта Садлоу II, сродство уменьшалось в порядке от ЧСА к КСА и БСА. Существенные различия наблюдались в сродстве к билирубину: оно было самым высоким для БСА, а затем снижалось для КСА и ЧСА [121].

Таким образом, анализ литературных источников не выявил определенных закономерностей, по которым можно заранее предсказать, будут ли конкретные эндогенные и экзогенные лиганды эффективнее взаимодействовать с ЧСА, КСА или БСА. Тем более, практически нет данных о том, существует ли разница в механизмах аллостерической модуляции в молекулах разных альбуминов. Так, установлено, что альбумин человека при взаимодействии с ЖК в растворе обладает значительной гибкостью и пластичностью, тогда как характеристики бычьего альбумина в растворе по отношению к ЖК практически не отличаются от расчетных данных, полученных для его кристаллической структуры [128]. В условиях *in vitro* гликирование по-разному влияет на антиоксидантные свойства ЧСА и БСА [131]. Поэтому вопрос о видовых различиях в модуляции функциональных свойств альбумина требует дальнейшего изучения.

## **1.6. Методы изучения связывающей и ферментативной активности альбумина**

### *1.6.1. Применение метода ЯМР-спектроскопии в изучении кинетики биохимических процессов*

ЯМР-спектроскопия – спектроскопический метод исследования молекул, в основе которого лежит явление ядерного магнитного резонанса. Суть явления состоит в том, что при наложении внешнего магнитного поля реализуются два энергетических состояния ядра: с низким и высоким уровнем энергии, и условие резонанса выполняется при переходе с низкого энергетического уровня на высокий. От окружения протона внутри молекулы в значительной степени зависит, при какой частоте внешнего поля происходит резонанс в ядрах. Поэтому спектры ЯМР являются такими информативными. Например, ядрам водорода, занимающим различные положения внутри молекулы, всегда соответствуют разные линии в спектре ЯМР. Метод ЯМР является одним из самых чувствительных методов в области исследования структуры: сигналы от различных ядер одного и того же элемента всегда оказываются хорошо разрешенными, поскольку каждое из этих ядер имеет своё химическое окружение, влияющее на спектр [8]. Когда молекула меняет своё химическое окружение, — это может происходить, например, в процессе химической реакции, — то спектры ядер этой молекулы могут дать информацию о том, как быстро происходят эти изменения. Так же с помощью метода ЯМР спектроскопии можно измерить расстояния между ядрами, используя эффект Оверхаузера, что актуально для сложных многоатомных систем, в частности, для фермент-субстратных комплексов.

В основе метода ЯМР-спектроскопии лежат фундаментальные свойства атомного ядра: мы можем наблюдать изменение основных параметров ЯМР спектра, таких как химический сдвиг и константа спин-спинового взаимодействия, когда происходят изменения в окружении исследуемого ядра. Известно, что химический сдвиг зависит от пространственной структуры молекулы, поэтому считается, что ЯМР-спектр – это уникальная характеристика каждой молекулы,

своеобразный «отпечаток». Такие «отпечатки» позволяют нам судить о составе и количестве исследуемых веществ в растворе.

В экспериментах, в которых осуществляется наблюдение за протеканием определённой химической реакции, основной целью является зафиксировать сигналы исходных веществ и продуктов реакции, содержащихся в реакционной смеси. По амплитуде сигнала можно отслеживать убыль исходного субстрата и увеличение концентрации продуктов. Это открывает большие возможности для наблюдения за биохимическими процессами, в частности для изучения кинетики ферментативных реакций. Так, с помощью метода ЯМР удалось определить кинетические характеристики  $K_M$  и  $V_{max}$  реакции расщепления сахарозы инвертазой [53]. Метод ЯМР-спектроскопии был успешно применен для описания стереоспецифичности действия  $\alpha$ -галактозидазы: было показано, что в первые минуты реакции регистрируется только  $\alpha$ -аномер галактозы, лишь какое-то время спустя детектируется появление  $\beta$ -аномера, который образуется в результате мутаротации  $\alpha$ -аномера [3]. В представленной работе мы впервые применили метод ЯМР-спектроскопии для анализа истинно эстеразной активности сывороточного альбумина.

#### *1.6.2. Спектрофотометрический метод определения скорости ферментативных реакций*

Накопление продуктов реакции гидролиза различных субстратов удобнее всего регистрировать спектрофотометрически. Обычно для такого рода исследований используются синтетические субстраты, при распаде которых один из продуктов реакции в свободном виде является хромофором или флуорофором – это приводит к тому, что в ходе реакции в растворе образуется метка, присутствие которой и может наблюдаться спектрофотометрически. Это значительно упрощает наблюдения за ходом ферментативных реакций. Так, для изучения работы КЭ широко применяется НФА, для исследования работы PON-1 – параоксон. Нитрофенол, образующийся в результате гидролиза НФА и параоксона, имеет желтую окраску и может быть детектирован на

спектрофотометре на длине волны 400-405 нм. По этой же причине НФА и параоксон применяют и для изучения ферментативной активности альбумина [64]. Единственным недостатком этих субстратов применительно к альбумину является то, что нитрофенол является продуктом как псевдо-, так и истинно эстеразной активности белка, поэтому детекцией одного лишь нитрофенола невозможно отделить кинетику одного сайта от другого. Именно поэтому для детекции ацетатной группы – специфического продукта истинно эстеразного гидролиза альбумина по отношению к НФА – необходимо применение других методик, в частности, ЯМР-спектроскопии.

### *1.6.3. Методы молекулярного моделирования*

С увеличением компьютерных мощностей все большее распространение получают расчетные методы молекулярного моделирования, которые помогают выявить важные особенности структуры и механизма действия биологических молекул, которые невозможно определить экспериментально. С другой стороны, известные экспериментальные данные могут и должны быть использованы для теоретического моделирования.

Существует огромное количество вычислительных методов, адаптированных для решения различных задач. Для наиболее полного описания взаимодействий между двумя молекулами применяют квантово-механические методы [41]. В методах квантовой химии молекула описывается как устойчивая система ядер и электронов. Энергия системы в этом подходе определяется из решения стационарного уравнения Шредингера. Однако, обычно уравнения, получаемые для всех возможных состояний системы, настолько сложны, что невозможно найти их решения в общем виде – ввиду этого квантово-механический подход в чистом виде не применяют для описания макромолекулярных систем. Для изучения взаимодействия белков и лигандов нашли широкое применение подходы, основанные на приближении молекулярной механики: методы молекулярного докинга и молекулярной динамики. В отличие от квантово-механических алгоритмов, в которых молекула рассматривается как комплекс ядер и электронов,

в приближении молекулярной механики молекула описывается в виде системы атомов. При этом законы взаимодействия между атомами определяются эмпирически установленными функциями. В приближении молекулярной механики длины связей обычно принимаются постоянными, а энергию молекулы определяют по формуле:

$$E = E_{\text{торс}} + E_{\text{нев}} + E_{\text{угл}} + E_{\text{вс}} + E_{\text{гидр}},$$

где  $E_{\text{эл}}$  и  $E_{\text{нев}}$  – соответственно энергии электростатических и невалентных взаимодействий всех пар валентно несвязанных атомов,  $E_{\text{торс}}$  – торсионная энергия, определяемая наличием барьеров внутреннего вращения,  $E_{\text{угл}}$  – энергия упругой деформации валентных углов,  $E_{\text{вс}}$  – энергия водородных связей,  $E_{\text{гидр}}$  – энергия гидратации. Каждое слагаемое зависит от расстояний между атомами, валентных и торсионных (двугранных) углов, типов атомов и кратностью связей. Для описания каждого энергетического слагаемого используется потенциальная функция, коэффициенты которой подбираются на основании большого объема эмпирических данных.

Первым методом, который мы использовали при изучении наших систем является метод молекулярного докинга. Суть этого метода заключается в том, что молекула лиганда помещается в сайт связывания, и с помощью анализа различных взаимных ориентаций частей этой системы друг относительно друга ведется поиск минимального значения энергии взаимодействия. При помощи этого метода могут быть определены особенности сайтов связывания, подобраны лиганды для каждого из сайтов, а также созданы новые лиганды, эффективно взаимодействующие с молекулой-мишенью [55, 75, 164]. Метод успешно применяется в фармакологических исследованиях на стадии разработки препаратов.

Обычно в качестве трёхмерной модели молекулы-мишени используют структуры, полученные экспериментально: с помощью рентгеноструктурного анализа, ЯМР или криогенной микроскопии. В отсутствие экспериментальных данных, трёхмерная структура белка может быть получена методом гомологичного моделирования, который заключается в том, что 3d-модель строится по его

первичной аминокислотной последовательности и известным трехмерным структурам белков-гомологов [70]. Трехмерные модели лигандов, в силу большей простоты молекулярной структуры, конструируют в специальных химических редакторах, которые часто бывают встроены в программные пакеты, предназначенные для докинга.

Программ, в которых можно осуществлять докинг молекулы лиганда в сайт связывания белка, существует немало. Программа проводит перебор возможных конформаций и взаимного расположения белка и лиганда с целью поиска минимального значения энергии взаимодействия. Существуют различные алгоритмы такого перебора: метод Монте-Карло, генетический алгоритм. Для ранжирования конформаций белок-лиганд применяют оценочные функции (ОФ). Основные сложности отбора правильных конформаций состоят в следующем: 1) перебор всех конформационных состояний требует немало времени, современные методы конформационного поиска не могут проверить их все; 2) существующие ОФ не способны учесть все детали взаимодействия между лигандом и сайтом связывания белка (изменение энтропии, влияние растворителя). Поэтому результатом конформационного поиска обычно является не одна, а несколько возможных конформаций, из которых отбирают наиболее вероятную, основываясь на известных эмпирических данных [9].

Развитие уже существующих алгоритмов для докинга, их оптимизация, а также поиск новых являются актуальными задачами в области молекулярного моделирования. В современных программах используют два основных подхода к процедуре докинга: жёсткий и гибкий. В первом подходе конформационная подвижность белка и лиганда не учитывается, варьируется лишь положение лиганда внутри сайта. Это существенно упрощает задачу поиска, но точность полученного результата минимальна. Этот подход чаще всего используют в тех случаях, когда лиганд ко конкретному белку неизвестен, и среди десятков тысяч низкомолекулярных веществ надо отобрать те, которые принципиально могут быть лигандами для этого белка. Такая процедура называется виртуальным скринингом.

В отличие от жёсткого докинга, гибкий докинг позволяет учитывать конформационные изменения молекулы лиганда, но молекула белка обычно тоже фиксирована. Многие современные программы позволяют варьировать и конформацию лиганда, и конформацию аминокислот сайта связывания. Однако и в этом случае существует упрощение: на первом этапе конформация сайта связывания не варьируется, результатом этого шага является набор конформаций белок-лиганд с наименьшей энергией связывания. И лишь на втором этапе структура полученных комплексов оптимизируется с возможностью варьировать конформацию сайта связывания.

Учёт конформации как лиганда, так и белка, позволяет решать задачи с высокой степенью точности, но такие задачи редко решаются исключительно методом молекулярного докинга. Как правило, если необходимо учесть подвижность всей белковой молекулы, применяют метод молекулярной динамики (МД). Это гораздо более мощный инструмент, с помощью которого можно определить конформационное поведение системы с помощью интегрирования уравнений движения атомов. Уравнения движения соответствуют классическим ньютоновским уравнениям механики. Применять метод МД для изучения биологических макромолекул, в частности белков, начали ещё в 1977 г. [107]. Эта публикация стала настоящим прорывом в области применения компьютерных технологий к исследованию молекулярных систем.

Метод МД позволяет воссоздавать в вычислительных экспериментах различные экспериментальные условия. В самых первых работах в силу ограничений вычислительных мощностей при расчете конформационных изменений белков макромолекулы представляли в виде одиночных изолированных структур в вакууме, не учитывая влияния растворителя и «соседних» молекул самого белка [15]. Позднее в модели были добавлены молекулы растворителя в явном виде и был разработан подход, называемый «периодические граничные условия». Этот подход заключается в том, что молекула белка в растворителе представляется в виде одной из множества ячеек кубической, октаэдрической или

додекаэдрической формы, которая повторяется по всем направлениям. Таким образом, создаётся своего рода трехмерная пространственная решетка из повторяющихся ячеек: центральная ячейка и вокруг ее копии. При таком подходе можно быть уверенным, что все атомы системы окружены атомами-соседями, неважно, оригинальные ли это атомы или их копии. Это позволяет сэкономить вычислительную мощность, моделируя атомы одной ячейки, но при этом учитывая тот факт, что моделируемая молекула белка окружена другими молекулами в растворе [10].

Длина траектории или длина симуляции МД – это то время, в течение которого наблюдается система. Выбор длины траектории зависит от сложности системы и поставленных задач. Так, в ряде работ длина симуляции составляет десятки микросекунд [141], однако для изучения глобулярных белков длину траектории чаще всего выбирают равной 10-200 нс.

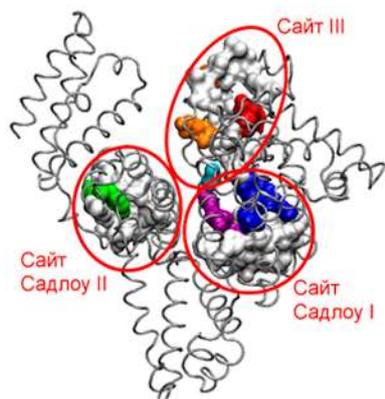
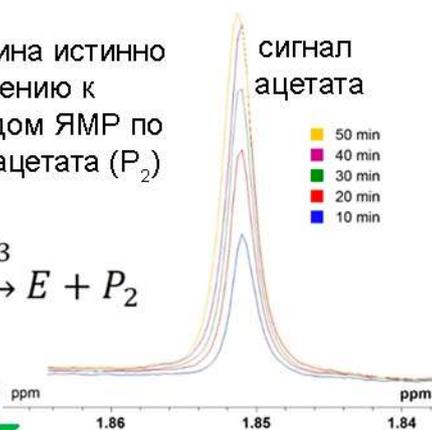
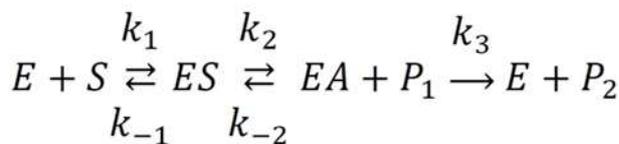
С помощью метода МД можно изучить систему достаточно подробно: например, установить пути проникновения лиганда внутрь каталитического центра фермента, выявить роли различных доменов белка в ходе взаимодействия и даже указать конкретные аминокислотные остатки, оказывающие значительное влияние на ход реакции.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Дизайн эксперимента**

Общая схема исследования представлена на рисунке 2.1. На первом этапе методом ЯМР детектировали продукты гидролиза НФА в присутствии БСА. Прирост интенсивности сигнала ацетатной группы свидетельствует о наличии у альбумина истинно эстеразной активности. Далее методом молекулярного моделирования проводили поиск сайта/сайтов истинно эстеразной активности белка. Полученную информацию использовали в дальнейших экспериментах по изучению влияния различных модуляторов на связывающую и гидролитическую активность альбуминов разных видов.

Доказательство наличия у альбумина истинно эстеразной реакции по отношению к *n*-нитрофенилацетату (НФА) методом ЯМР по выходу нехромогенного продукта ацетата ( $P_2$ )



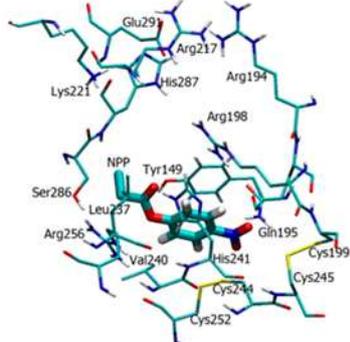
Поиск сайта (сайтов) истинно эстеразной активности альбумина методами молекулярного моделирования



Исследование влияния модуляторов на активность сайтов псевдо и истинно эстеразной активности альбуминов разных видов



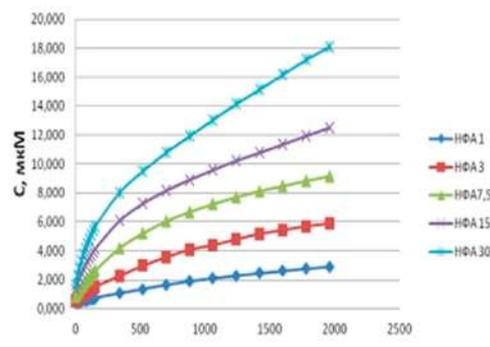
In silico на примере НФА и параоксона



- Конформационный анализ
- Оценка свободной энергии связывания



In vitro (спектрофотометрия) на примере НФА



- Расчет термодинамических и кинетических констант

Анализ и выводы

Рисунок 2.1 – Общий дизайн эксперимента

Влияние модуляторов изучали в вычислительных экспериментах *in silico* (молекулярный докинг и молекулярная динамика) и биохимических экспериментах *in vitro* (спектрофотометрическая детекция выхода продукта гидролиза НФА *n*-

нитрофенола в присутствии БСА и модуляторов). Методы молекулярного моделирования позволяют провести конформационный анализ взаимодействия лигандов с белком и оценить свободные энергии связывания, биохимические эксперименты – рассчитать термодинамические и кинетические константы гидролиза. Полученные данные были проанализированы и сформулированы выводы диссертационной работы о механизме модуляции альбумина.

## **2.2. Материалы и реагенты**

Были использованы следующие коммерчески доступные реагенты: свободный от жирных кислот БСА, НФА, триметилсилилпропансульфонат натрия (DSS), тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), цистеина гидрохлорид, 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ), дитиотреитол (ДТТ), атропин, реактив Бредфорда, 4Н-1,3,2-Benzodioxaphosphorin, 2-(2-methylphenoxy)-, 2-oxide (CBDP), этопропазин (все - Sigma Aldrich), 4-нитрофенол (Acros Organic), пропионовая кислота (Chemical Line), тионил хлорид (Вектон), буфер фосфатно-солевой (Биолот), диазепам (Релиниум, Польша), вода бидистиллированная. Карбоксим был предоставлен сотрудниками НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России при проведении совместных работ. Дейтерированный диметилсульфоксид (DMSO d6) и дейтерированная вода были предоставлены Ресурсный центр «Магнитно-резонансные методы исследования» СПбГУ. Нитрофенилпропионат (НФП) был синтезирован из 4-нитрофенола и пропионовой кислоты с использованием тионилхлорида в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России; по данным ЯМР-анализа содержание НФП составляло не менее 90%.

## **2.3. ЯМР спектроскопия**

В день эксперимента готовили раствор БСА в смеси ФБ и дейтерированной воды (9:1), а также растворы НФА и НФП в DMSO d6 и раствор внутреннего стандарта DSS в бидистиллированной воде. Реакционную смесь для регистрации

гидролиза НФА и НФП под действием БСА готовили путем смешивания растворов БСА и DSS, затем непосредственно перед записью спектра добавляли раствор субстрата. В конечной реакционной смеси концентрация БСА составляла 360 мкМ, концентрация DSS – 1 мМ, концентрация субстрата – 7.2 мМ. Подготовленные образцы сканировали с помощью одномерного  $^1\text{H}$  ЯМР на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 500 при комнатной температуре (25°C). Для подавления сигнала воды использовали метод «Excitation sculpting». Спектры записывали каждые 3 мин. Для реакционной смеси БСА-НФА в каждой временной точке проводили 8 сканирований, для смеси БСА-НФП – 4 сканирования. Релаксационную задержку устанавливали равной 15 сек для взаимодействия БСА-НФА и 10 сек для взаимодействия БСА-НФП. Химические сдвиги  $\delta$  компонентов раствора с точностью до 0.001 м.д. калибровали по тетраметилсилану  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ .

#### **2.4. Электрофорез альбумина в полиакриламидном геле**

Электрофорез препарата БСА Sigma Aldrich в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) проводили в электрофоретической камере «Mini-Protean» (BioRad). Перед нанесением на гель к образцам белка добавляли буфер, содержащий Tris-HCl (0.125M, pH 6.8), глицерин (20%), SDS (4%), бромфеноловый синий (0.002%). К части образцов был также добавлен 10% ДТТ. Концентрация раствора БСА составляла 4мг/мл. На дорожку 1 наносили 3 мкл маркера BLUelf Prestained Protein Ladder (GeneDirex). На дорожки 3-7 наносили 1, 2, 5, 10 и 15 мкл раствора БСА без добавления ДТТ. На дорожки 9-13 наносили 1, 2, 5, 10 и 15 мкл раствора БСА с добавлением ДТТ. Гели после электрофореза окрашивали 0.01 % раствором Кумасси R-250.

#### **2.5. Определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии альбумина методом спектрофотометрии**

Активность СА по отношению к НФА определяли методом спектрофотометрии (405 нм) на планшетном ридере ClarioStar Plus (BMG Labtech)

по накоплению *n*-нитрофенола, образующегося в результате гидролиза НФА. Ферментативную скорость рассчитывали как отношение разницы в концентрации к разнице во времени, за которое произошло это изменение. Для первой фазы (предстационарной) рассчитывали скорость в диапазоне 0-60 секунд. Для второй фазы (стационарной) рассчитывали скорость в диапазоне 300-900 секунд. Характеристики  $K_M$  (константа Михаэлиса) и  $V_{max}$  (максимальная скорость реакции) для коммерческого и окисленного БСА рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа по модели ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен.

## **2.6. Влияние модуляторов на эстеразную активность сывороточного альбумина**

Исследование влияния модуляторов (жирных кислот, экстракта зелёного чая, бензодиазепина диазепам и реактиватора ХЭ карбоксима) на связывающую и гидролитическую активность альбумина проводили в режиме предварительной инкубации исследуемого модулятора в растворе СА в течение 30 мин при комнатной температуре (25° С). Активность альбумина по отношению к НФА определяли спектрофотометрически (405 нм) по накоплению *n*-нитрофенола, образующегося в результате гидролиза НФА. Каждый эксперимент проводили трижды, в одном эксперименте показания снимали в трех повторах. Схема размещения проб представлена таблице 2.1. Общее число повторов для каждого модулятора составило 9. Полученные данные подвергали первичной обработке в MS Excel. Далее рассчитанные значения скоростей реакции переносили в программу GraphPad Prism. Константы связывания, ингибирования, а также максимальная скорость для каждой реакции рассчитывались с помощью нелинейного регрессионного анализа по модели ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен. Статистическую значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

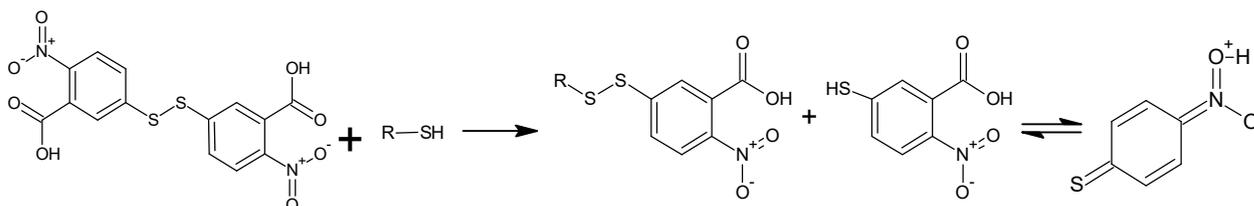
**Таблица 2.1** – Схема размещения проб в лунках планшета для считывания абсорбции растворов при  $\lambda=405$  нм

ФСБ (270 мкл) + НФА (30 мкл), 3 повтора
БСА + ФСБ (270 мкл) + НФА (30 мкл), 3 повтора
БСА + Модулятор в ФСБ (270 мкл) + НФА (30 мкл), 3 повтора

Были исследованы следующие модуляторы: олеиновая кислота (раствор 5, 10, 20, 30 мкМ); пальмитиновая кислота (раствор 5, 10, 20, 30 мкМ); мажорный полифенол зеленого чая (ЭЗЧ) эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ, раствор 20, 25, 40, 50 мкМ); диазепам (239.5 мкМ, 167.24 мкМ, 90.1 мкМ, 46.6 мкМ); карбоксим (408.0 мкМ, 271.0 мкМ, 127.3 мкМ, 63.6 мкМ).

## 2.7. Влияние окисления свободных тиоловых групп БСА на его связывающую и эстеразную активность

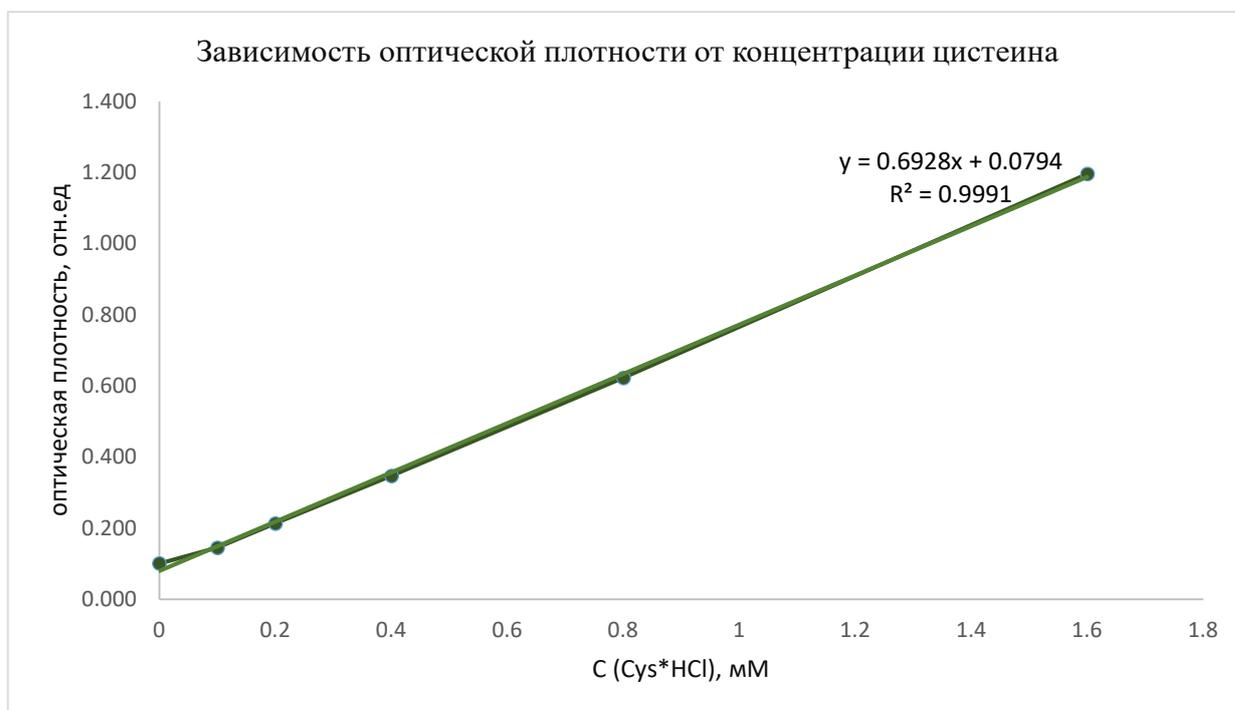
Для определения количества свободных тиоловых групп в БСА был использован реактив Элмана (ДТНБ), который вступает в реакцию в стехиометрическом соотношении с тиолами. Химизм процесса заключается в образовании продукта реакции, 2-нитро-5-сульфанилбензойной кислоты, которая переходит в хиноидную форму, поглощающую свет при длине волны 412 нм. (рисунок 2.2)



**Рисунок 2.2** – Схема реакции: образование хромофора - 2-нитро-5-сульфанилбензойной кислоты при добавлении реактива Элмана к БСА.

Количество свободных тиоловых групп в БСА определяется с помощью калибровочного графика, построенного с известными концентрациями цистеина

гидрохлорида (рисунок 2.3). В ходе эксперимента готовили буферный натрий-фосфатный раствор (ФБ) 10 мМ, содержащий 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), рН=8.0. Затем был приготовлен раствор цистеина гидрохлорида, 1.6 мМ. Приготовили аликвоты цистеина с концентрациями 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 мМ. Проведение реакции осуществляли путем смешивания реагентов в последовательности 50 мкл раствора ДТНБ, 1250 мкл ФБ, 125 мкл раствора образца (БСА или цистеина гидрохлорида) и инкубирования в течение 15 мин при комнатной температуре. Для измерения вносили 200 мкл из каждой пробирки в лунки 96-луночного планшета в тройном повторе и измеряли оптическую плотность при длине волны 408 нм. Коэффициент экстинкции равен  $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [39].

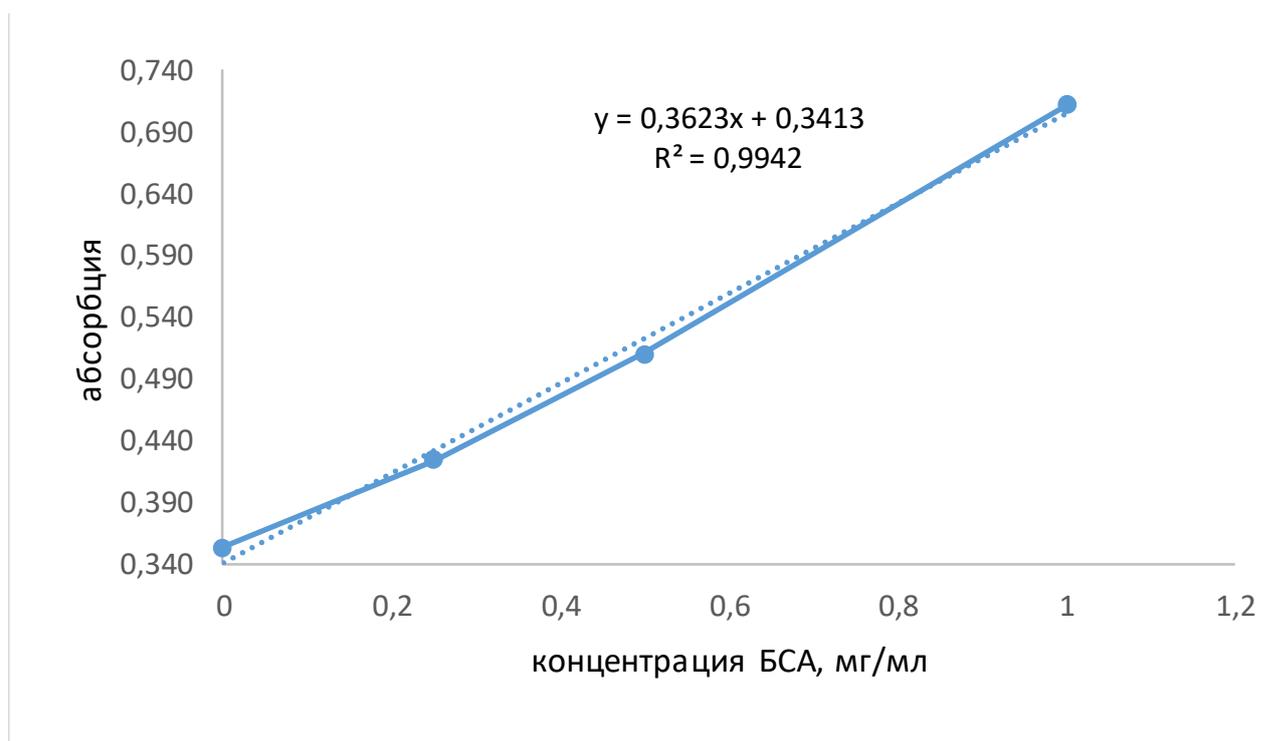


**Рисунок 2.3** – Калибровочный график зависимости оптической плотности от количества свободных тиоловых групп.

По уравнению калибровочного графика находили количество свободных тиоловых групп в БСА, методом остаточной дисперсии определяли погрешность измерений. Для учета потери белка при фильтрации на следующем этапе строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации БСА

до фильтрации (рисунок 2.4). С помощью полученной зависимости определили, что потери на фильтре у трех неизвестных образцов составили 16.2%.

Для восстановления свободных тиоловых групп БСА (10 мкМ) использовали ДТТ. В работе [60] было подобрано оптимальное соотношение ЧСА-ДТТ, при котором восстанавливалось максимальное количество Cys-34 и при этом не восстанавливались внутримолекулярные дисульфидные связи. Опираясь на опубликованные данные, в своей работе с БСА мы взяли такой же диапазон соотношений – от 1:1 до 1:10 по молярному количеству веществ для подбора оптимального соотношения. По уравнению калибровочного графика из значения оптической плотности была рассчитана концентрация свободных тиоловых групп в восстановленной белке. Трехкратного избытка ДТТ по отношению к БСА, так же, как и в работе [60], оказалось достаточно для восстановления максимального количества Cys-34.



**Рисунок 2.4** – Калибровочный график для определения потерь на фильтре, зависимость оптической плотности от концентрации БСА до фильтрации.

## **2.8. Молекулярные механизмы аллостерических эффектов в альбумине по данным молекулярного моделирования**

### *2.8.1. Подготовка трехмерных моделей*

Трёхмерные модели низкомолекулярных лигандов были построены и оптимизированы методом минимизации энергии с применением программы HyperChem 8.0 [59]. В качестве трёхмерных моделей ЧСА и БСА использовали данные РСА из базы данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB), коды структур 2bxd, 2bxg, 4jk4. Трёхмерная модель КСА была построена ранее сотрудниками ИЭФБ методом гомологичного моделирования [11].

Модели ЧСА и БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой и сульфиновой кислот, были построены следующим образом. На основании имеющейся информации о зарядах на атомах, длинах связей, значениях валентных и торсионных углов для разных типов атомов и атомных групп, представленной в базе данных программного пакета GROMACS [13], были описаны структуры окисленных цистеинов. Затем описания были добавлены в библиотеку структур аминокислот этого пакета. На основании внесенных данных, из исходных структур ЧСА и БСА с восстановленным Cys34 программой были сгенерированы модели с окисленным альбумином, которые затем были оптимизированы методом минимизации энергии.

Модель цистеинилированного БСА (cysБСА) конструировали следующим образом. На основании имеющейся информации о зарядах на атомах, длинах связей, значениях валентных и торсионных углов для разных типов атомов и атомных групп, представленной в базе данных программного пакета GROMACS [13], была описана топология аминокислотного остатка цистеина, связанного через дисульфидную связь со свободным цистеином. Подготовленная топология была добавлена в библиотеку структур аминокислот этого пакета. Затем провели молекулярный докинг молекулы свободного цистеина в сайт Cys34 молекулы БСА. На основании внесенной в библиотеку топологии из полученного методом молекулярного докинга комплекса, программой GROMACS была сгенерирована

структура цистенилированного БСА, которую затем оптимизировали методом минимизации энергии. Подготовленные 3d-модели белков и лигандов на следующем шаге использовали для процедуры молекулярного докинга.

### *2.8.2. Метод молекулярного докинга*

Метод молекулярного докинга представляет собой так называемую «стыковку» молекулы лиганда в центре связывания белка (или иначе мишени) с целью поиска локального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком. Метод позволяет определить функциональные особенности поверхности мишени и особенности взаимодействия молекул в комплексе, найти лиганды к конкретной мишени среди большого числа молекул или создать новые лиганды, способные эффективно взаимодействовать с данной мишенью. Докинг лигандов в центры связывания альбумина проводили с помощью программного пакета Autodock Vina 1.1.2 [152] и онлайн версии программы Rosetta (<http://rosie.rosettacommons.org/>) [101]. В исследуемом сайте связывания белка задавали область поиска размером  $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}^3$ . Результатом процедуры докинга являлся набор из 10 наиболее вероятных (энергетически выгодных) конформаций.

### *2.8.3. Метод молекулярной динамики*

Конформационные изменения комплексов альбумина с лигандами во времени были рассчитаны методом молекулярной динамики с помощью программного пакета GROMACS [13]. Каждый комплекс виртуально был помещен в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал SPC (single point charge) [29]. Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия. В расчетном эксперименте поддерживалась постоянная температура 300 К и постоянное давления 1 бар с помощью термостата «V-rescale» [36] и баростата Берендсена [28] с временными константами 0,1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [43]. При межатомном расстоянии больше 1 нм взаимодействиями Леннарда-Джонса пренебрегали. Длины связей в молекулах альбумина и лигандов поддерживались

постоянными с помощью алгоритма LINCS [74]. Перед расчётом конформационных изменений комплексов белок-лиганд система подвергалась релаксации продолжительностью 100-1000 пс. Время симуляции конформационных изменений комплексов методом молекулярной динамики (длина траектории) составило 10-50 нс с шагом интегрирования 0.002 пс. Реакцию между белком и лигандом считали потенциально возможной (или, другими словами, фермент-субстратный комплекс считали продуктивным) в случае сближения каталитической аминокислоты и лиганда ближе, чем на 0.4 нм.

#### *2.8.4. Оценка свободной энергии связывания*

Расчет свободной энергии связывания лигандов с альбумином проводили методом MM-PBSA [61] с помощью модуля `g_mmpbsa` [88], встроенного в программный пакет GROMACS. Значение свободной энергии образования комплекса вычисляли с шагом 100 пс в течение симуляции, следовательно, для каждой траектории число измерений составило 100. Итоговое значение рассчитывали как среднее  $\pm$  стандартное среднее отклонение. Достоверность отличий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Текущая реализация метода оценки свободной энергии в программе `g_mmpbsa` не включает расчет энтропийного компонента, поскольку вычисление энтропии является нетривиальной задачей и, согласно литературе, при расчете величина стандартной ошибки высока по сравнению с другими энергетическими составляющими. Создатели программы при подборе параметров для расчета энтальпийного компонента основывались на множестве экспериментальных данных и в своей публикации [88] показали, что в разработанном алгоритме значения свободной энергии хорошо коррелируют с экспериментальными данными. Такой подход не дает возможности рассчитать абсолютное значение аффинности, но позволяет провести сравнительный анализ эффективности взаимодействия белка с различными лигандами. В представленном исследовании мы изучали, как меняется взаимодействие параоксона с сайтами Садлоу при добавлении того или иного модулятора или окислителя. Поскольку речь идет о

сравнении эффективности связывания одного и того же лиганда в одном и том же сайте, использование только энтальпийной составляющей оправдано. В работах, применяющих этот подход, для полученных значений  $\Delta G$ , даже с учетом того, что это только энтальпия, все равно принято применять термин «свободная энергия», поэтому далее при описании результатов диссертационного исследования был применен термин «свободная энергия» согласно общепринятой терминологии.

#### 2.8.5. Валидация методов молекулярного моделирования

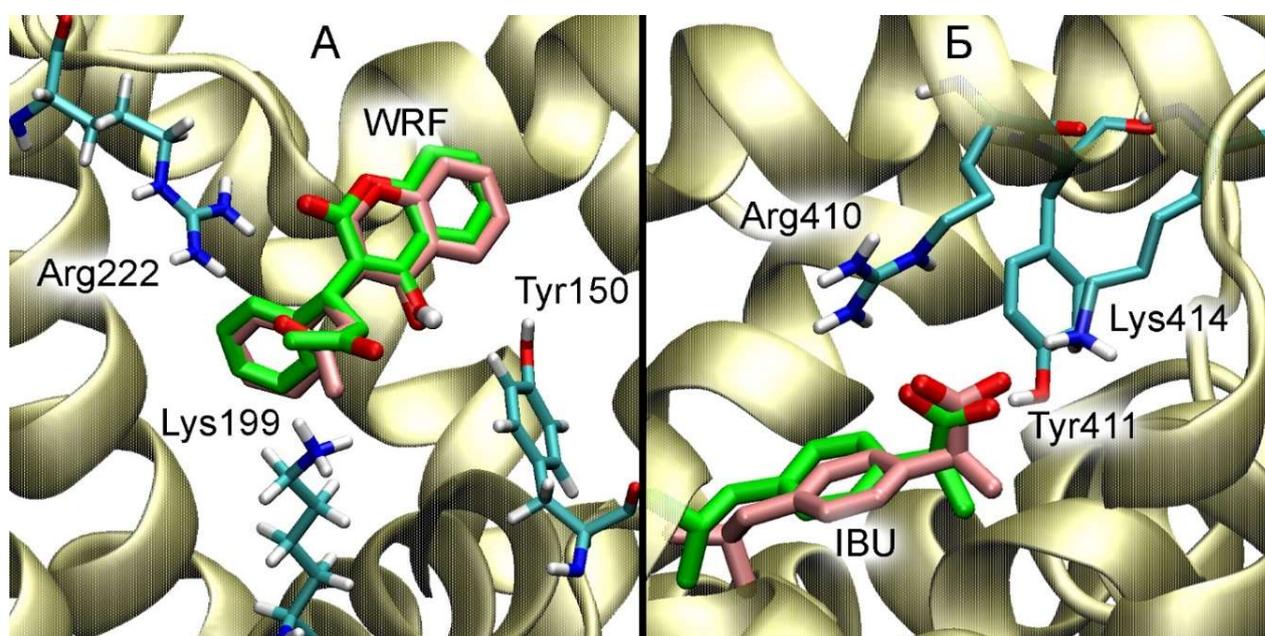
В базе данных PDB доступны трехмерные структуры комплексов ЧСА с варфарином и ибупрофеном (лигандами сайтов Садлоу I и Садлоу II, соответственно), которые были получены экспериментально методом рентгеноструктурного анализа (РСА). Чтобы подтвердить правомочность использования методов молекулярного моделирования при исследовании функциональных характеристик альбумина, в эксперименте *in silico* мы изучили взаимодействие ЧСА с варфарином и ибупрофеном, а затем сравнили полученный результат с известными экспериментальными данными.

На первом этапе был проведен молекулярный докинг варфарина и ибупрофена в сайты Садлоу. Результат представлен на рисунке 2.5. Ключевые расстояния между функционально значимыми атомами по данным докинга и РСА представлены в таблице 2.2.

Результат молекулярного докинга хорошо согласуется с экспериментальными данными. Исключение составляет лишь положение кетонной группы варфарина относительно гуанидиновой группы Arg222: по данным РСА кетонная группа взаимодействует с Arg222, а по данным молекулярного докинга – «развернута» в противоположную сторону (рисунок 2.5А). На следующем шаге стабильность полученных комплексов ЧСА с варфарином и ибупрофеном была проверена методом молекулярной динамики, длина траектории составила 50 нс. По полученным траекториям были рассчитаны средние и конечные значения расстояний между функционально значимыми атомами (таблица 2.2). Варфарин оставался связанным внутри сайта Садлоу I на

протяжении всей симуляции, более того, кетонная группа приблизилась к гуанидиновой группе Arg222, и положение лиганда в сайте стало лучше соответствовать экспериментальным данным. Ибупрофен согласно данным молекулярной динамики также оставался связанным внутри сайта Садлоу II.

Таким образом, результат, полученный совместным применением методов молекулярного докинга и молекулярной динамики, хорошо согласуется с экспериментальными данными. Методы компьютерного моделирования могут быть использованы для исследования функциональных характеристик альбумина.



**Рисунок 2.5** – Результат молекулярного докинга варфарина (WRF) в сайт Садлоу I (A) и ибупрофена (IBU) в сайт Садлоу II (Б) альбумина человека. Зеленым показана позиция лиганда по данным молекулярного докинга, розовым – положение лиганда, полученное экспериментально методом рентгеноструктурного анализа (РСА).

**Таблица 2.2** – Расстояния (Å) между функционально-значимыми атомами молекул варфарина (WRF), ибупрофена (IBU) и аминокислот сайтов Садлоу ЧСА по данным РСА, молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД).

	РСА	докинг	среднее значение за период симуляции МД	Конечное значение после симуляции МД
<b>Варфарин в сайте Садлоу I</b>				
O <sub>cycloester</sub> (WRF)-N <sup>η1</sup> (Arg222)	3.1	3.0	4.1	3.7
O <sub>phenol</sub> (WRF)-O <sup>ξ</sup> (Tyr150)	3.0	3.5	6.0	5.7
O <sub>ketone</sub> (WRF)-N <sup>η2</sup> (Arg222)	3.4	6.1	4.8	3.6
<b>Ибупрофен в сайте Садлоу II</b>				
O(IBU)-N <sup>η2</sup> (Arg410)	2.8	2.9	3.0	2.8
O(IBU)-O <sup>ξ</sup> (Tyr411)	2.7	3.0	4.4	2.7
O(IBU)-N <sup>ξ</sup> (Lys414)	3.0	3.2	6.0	5.9

O<sub>cycloester</sub>(WRF) – карбоксильный атом кислорода циклоэфирной группы варфарина, O<sub>phenol</sub>(WRF) – гидроксильный атом кислорода фенольной группы варфарина, O<sub>ketone</sub>(WRF) – атом кислорода кетонной группы варфарина, O(IBU) – один из атомов кислорода ибупрофена. Обозначения атомов аминокислот соответствуют рациональной номенклатуре.

## 2.9. Статистическая обработка данных.

Эксперименты *in vitro* по определению кинетических констант гидролиза НФА альбумином проводили в 9 повторах (3 эксперимента по 3 повтора в каждом). Полученные данные подвергали первичной обработке в MS Excel. Константы связывания, ингибирования, а также максимальная скорость для каждой реакции рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа по модели ферментативной кинетики Михаэлис-Ментен в виде  $\text{среднее} \pm \text{стандартное среднее отклонение}$ . В экспериментах *in silico* значение свободной энергии образования комплекса вычисляли с шагом 100 пс в течение симуляции, таким образом, для

каждой траектории число измерений составило 100. Итоговое значение рассчитывали как среднее  $\pm$  стандартное среднее отклонение. Статистическую значимость отличий средних величин оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использовали критерий согласия Пирсона с уровнем значимости 0.05.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Эстеразная активность сывороточного альбумина по данным ЯМР

При взаимодействии альбумина с НФА реакция проходит в 2 этапа: в первые несколько минут наблюдается значительное повышение активности, происходит быстрое образование основного продукта реакции – нитрофенола. Затем система переходит в стационарный режим, но не выходит на плато (рисунок 1.3). Если обратиться к схеме взаимодействия НФА с альбумином (схема 1), то на первом этапе взаимодействия субстрат связывается с активным центром белка с образованием фермент-субстратного комплекса ES, затем высвобождается продукт реакции *n*-нитрофенол ( $P_1$ ), фермент (EA) при этом ацетируется. На последнем этапе происходит деацетилирование альбумина и высвобождение ацетата ( $P_2$ ). Причем, ацетат высвобождается только в случае восстановления фермента, то есть его наличие в реакционной смеси является прямым доказательством наличия у альбумина истинно эстеразной активности. Однако, если выход нитрофенильной группы мы легко регистрируем спектрофотометрически на длине волны 405 нм, то ацетатная группа хромогенной не является, и потому регистрация её выхода сопряжена со значительными трудностями.

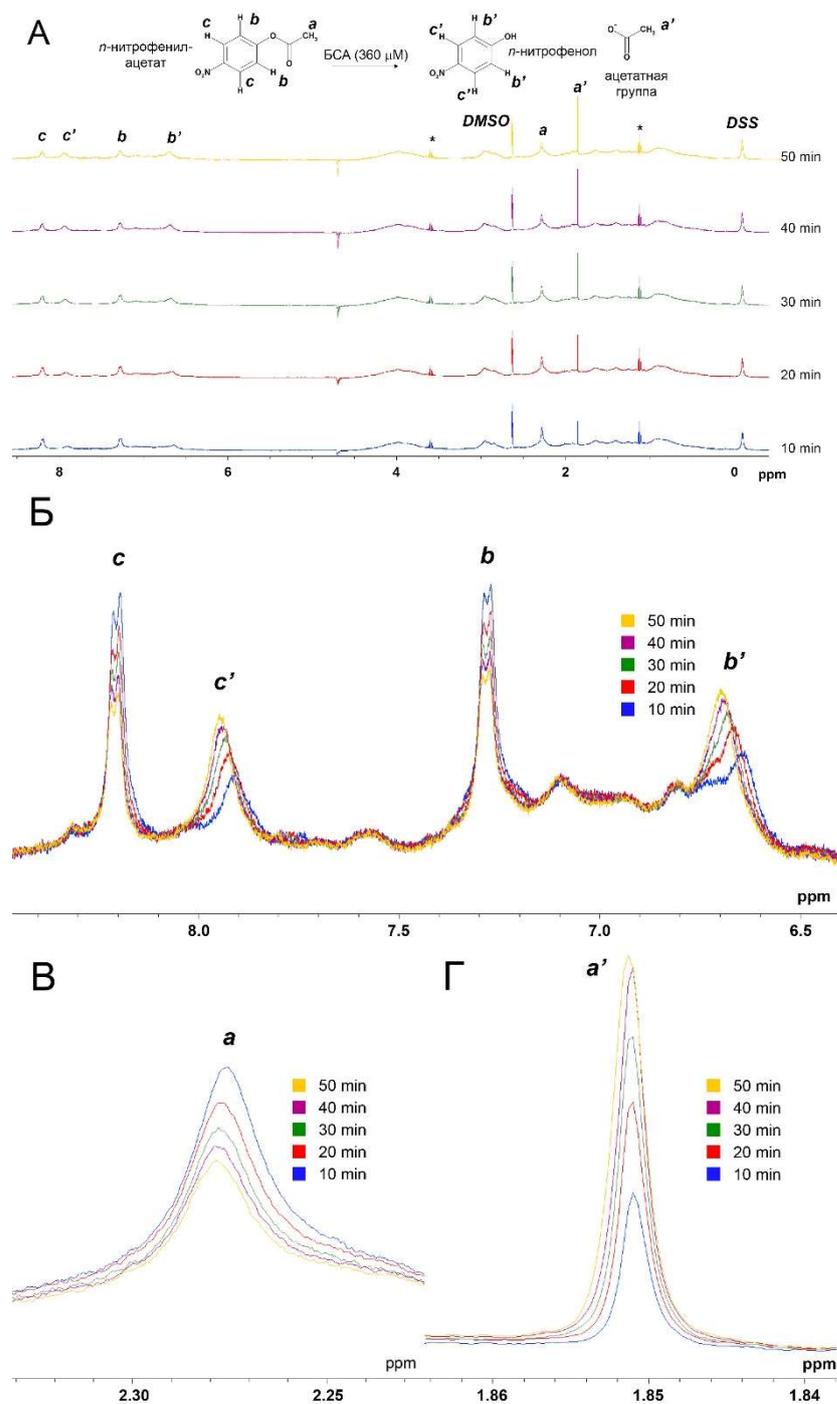
В данном исследовании с помощью метода  $^1\text{H}$  ЯМР мы провели качественный анализ выхода ацетата при взаимодействии БСА с НФА и НФП. На рисунке 3.1 представлена динамика изменения спектра реакционной смеси БСА и НФА. Процесс работы спектрометра таков, что между добавлением субстрата к ферменту и снятием первого спектра проходит 7-10 минут. К этому моменту сайты Садлоу II молекул БСА уже полностью ацетилированы [64, 99], поэтому

полученные спектры отображают кинетику исключительно истинно эстеразной реакции альбумина.

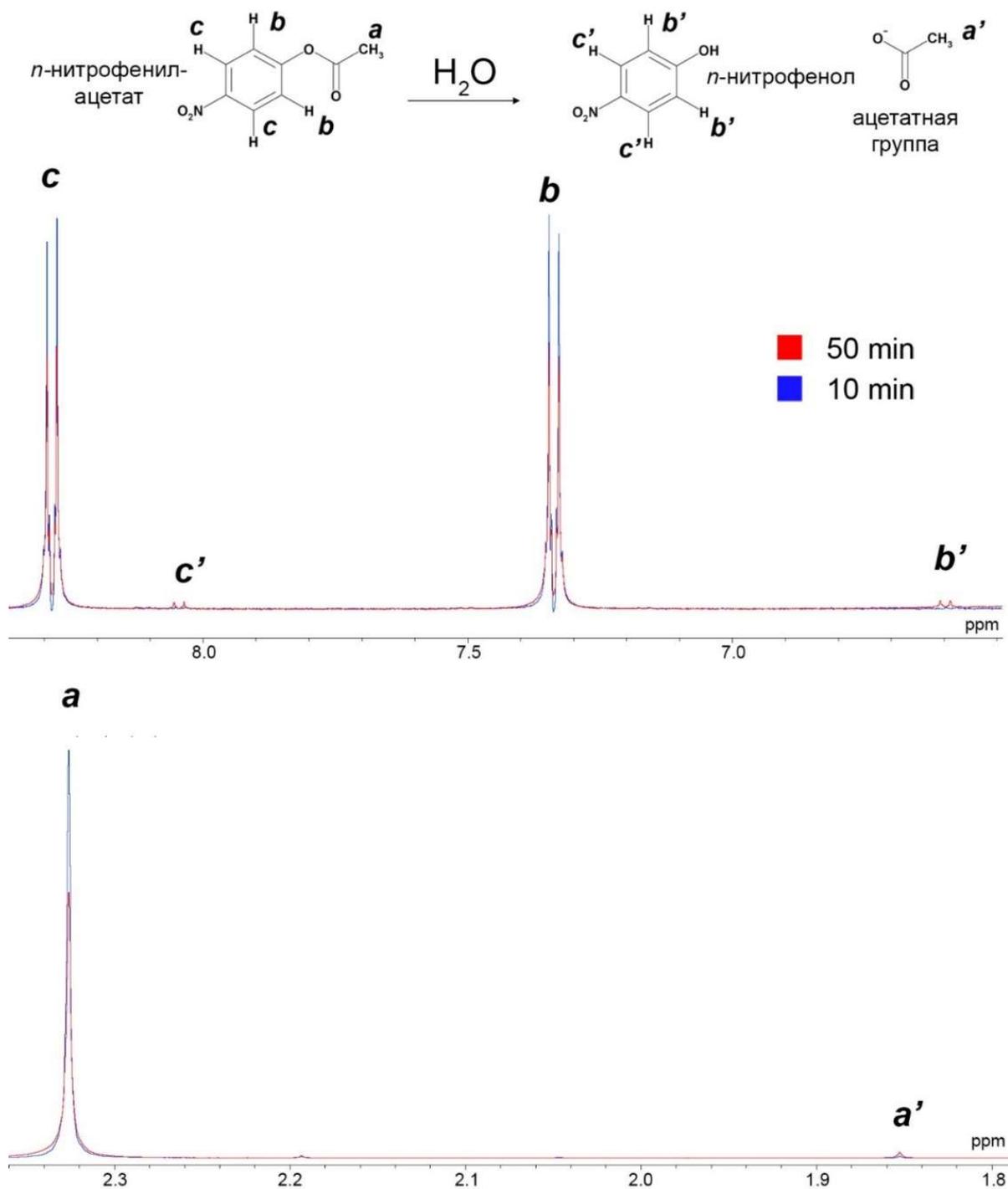
Так, к моменту снятия первого спектра уже заметны сигналы **c'** (7.90 ppm) и **b'** (6.65 ppm) первого продукта реакции *n*-нитрофенола (рисунок 3.1А, 3.1Б) и даже сигнал ацетата **a'** (1.85 ppm) (рисунок 3.1А, 3.1Г). Как видно из рисунков 3.1А, 3.1Б, 3.1В и 3.1Г, в течение 50 минут наблюдения усиливается интенсивность сигналов **a'**, **b'** и **c'**, соответствующим продуктам эстеразной реакции, и уменьшается интенсивность сигналов **a** (2.27 ppm), **b** (7.25 ppm) и **c** (8.2 ppm), соответствующим НФА. Наличие примесей (3.59 и 1.12 ppm, отмечены знаком \* на рисунке 3.1А), возможно, связано с промышленным синтезом НФА.

Изменения соответствующих сигналов НФА и продуктов его гидролиза в отсутствие БСА (спонтанный гидролиз) представлены на рисунке 3.2. Даже визуально заметно, что в случае спонтанного гидролиза увеличение интенсивности сигнала ацетата происходит существенно медленнее.

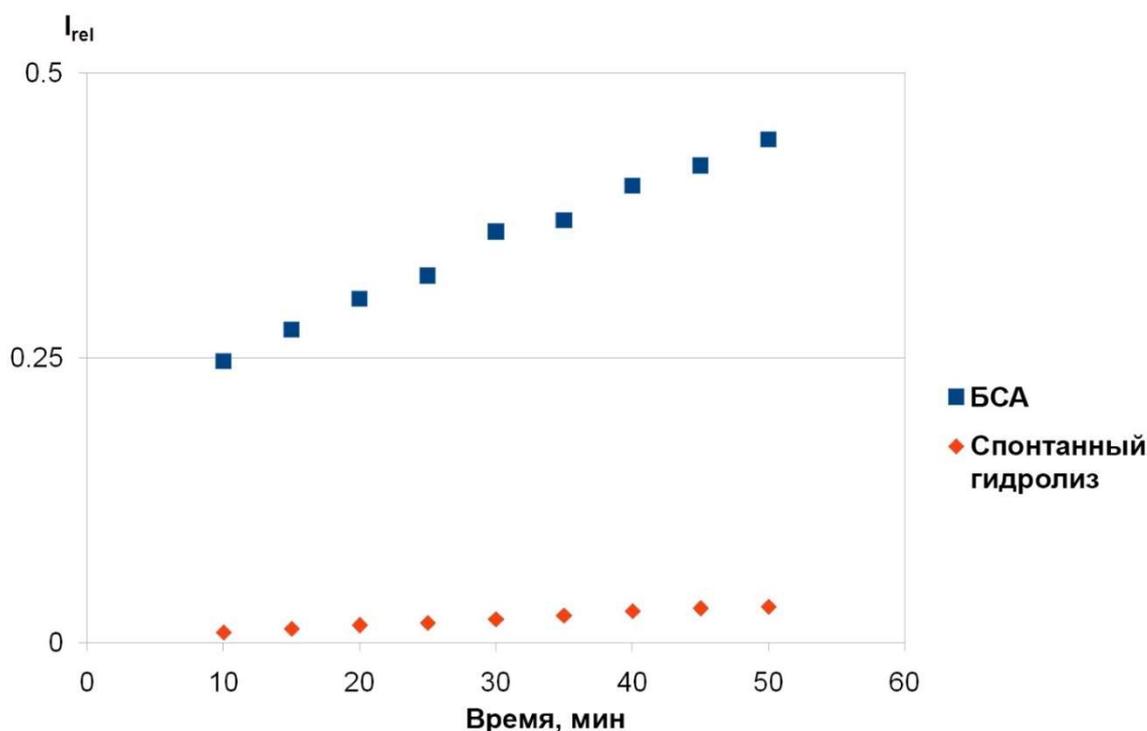
На следующем этапе для сравнения кинетики эстеразной активности альбумина со спонтанным гидролизом НФА мы построили зависимость относительной интегральной интенсивности сигнала ацетата от времени в присутствии и в отсутствие БСА в реакционной смеси (рисунок 3.3). Согласно полученным нами данным, накопление ацетата в присутствии БСА в реакционной смеси происходит значительно интенсивнее по сравнению со спонтанным гидролизом НФА. Полученные данные указывают на наличие у альбумина истинно эстеразной активности по отношению к НФА. Большинство исследователей склонны считать, что эстеразная активность альбумина объясняется медленным деацилированием Тур411 [1, 4]. Но как видно из рисунка 3.1, активный выход ацетата наблюдается уже в первые минуты взаимодействия БСА с НФА, тогда как время полужизни ацетилированного Тур411 составляет  $61 \pm 4$  часа [99]. Что касается аддуктов ацетата с другими аминокислотами, то только на их образование необходимо не менее 30 минут [99].



**Рисунок 3.1** – Кинетика гидролиза *p*-нитрофенилацетата (НФА) в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА). А – полный спектр; Б – ароматическая область спектра; В – сигнал ацетатной группы в составе НФА; Г – сигнал свободного ацетата. Знаком \* отмечены низкомолекулярные примеси. DSS – внутренний стандарт триметилсилилпропансульфонат натрия; DMSO – диметилсульфоксид.

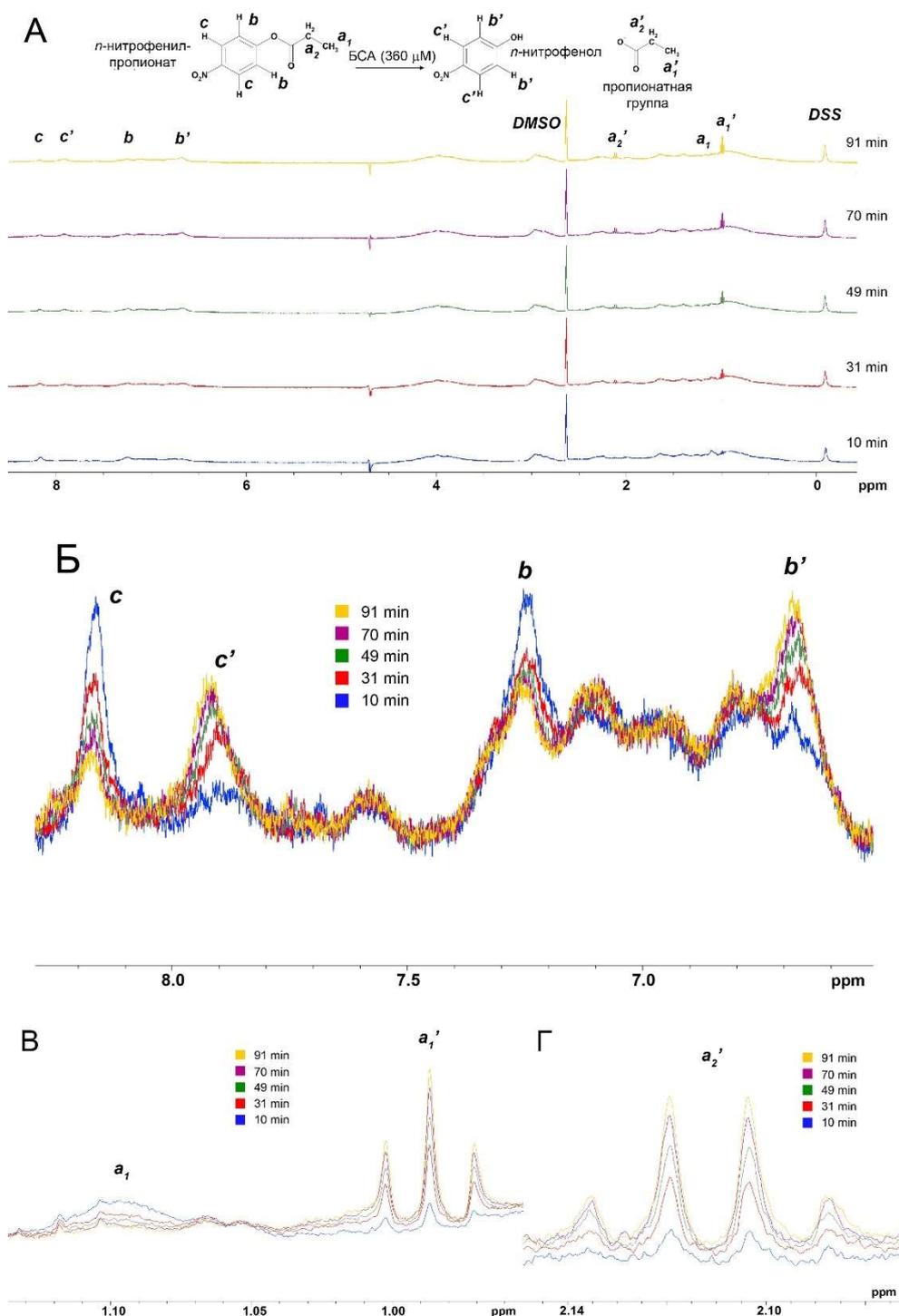


**Рисунок 3.2** – Кинетика спонтанного гидролиза НФА по данным ЯМР: ароматическая часть спектра (вверху) и алифатическая часть спектра (внизу).



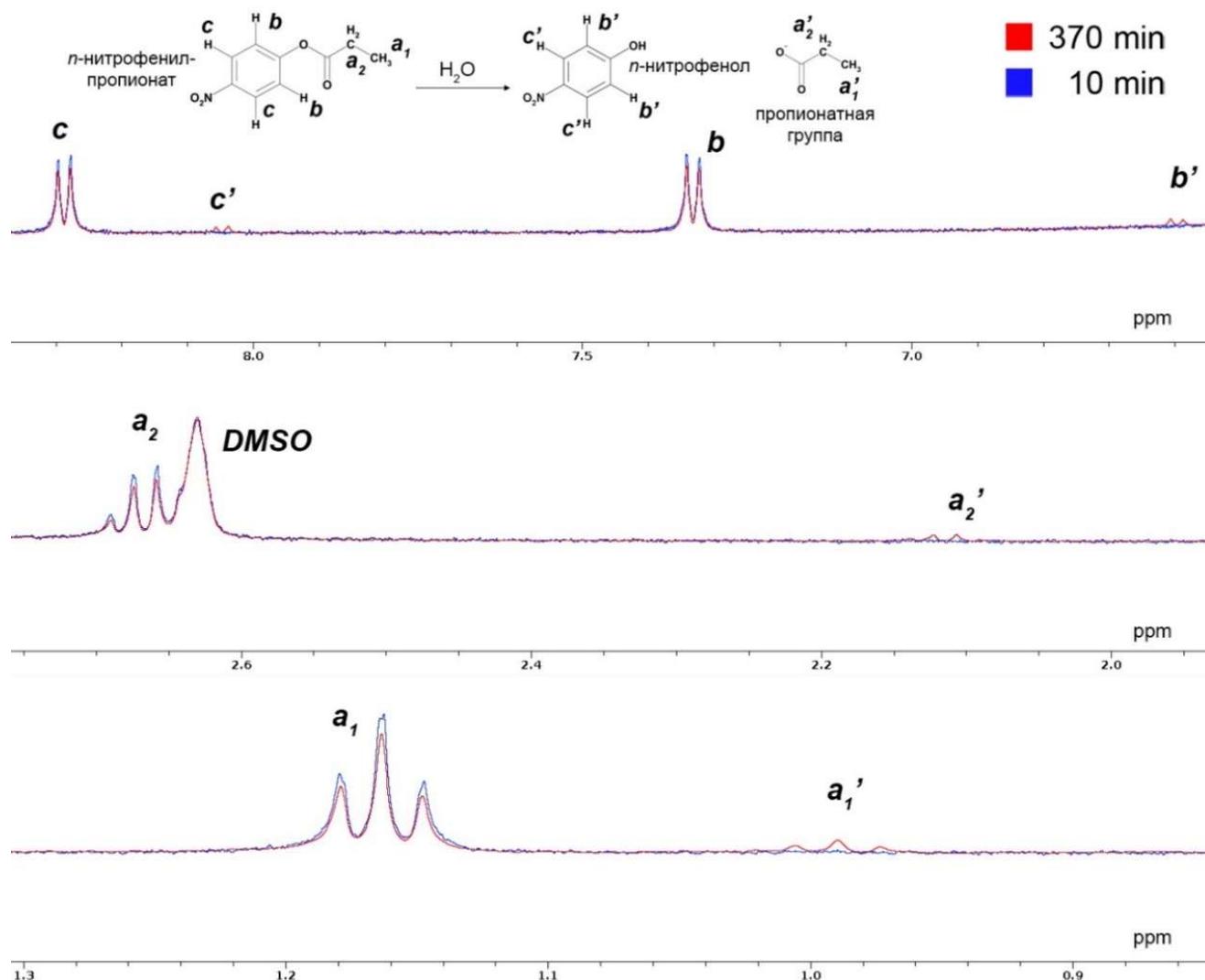
**Рисунок 3.3** – Зависимость относительной интегральной интенсивности  $I_{rel}$  сигнала ацетата в реакционной смеси в присутствии и в отсутствие БСА.  $I_{rel}$  рассчитывали как отношение интегральной интенсивности сигнала ацетата ( $I_{acetate}$ ) к интегральной интенсивности сигнала внутреннего стандарта триметилсилилпропансульфоната натрия ( $I_{DSS}$ ):  $I_{rel} = I_{acetate} / I_{DSS}$

Полученный результат подтверждает предположение о том, что в молекуле альбумина существует сайт истинно эстеразной активности, отличный от сайта Садлоу II. Чтобы подтвердить наши данные об истинно эстеразной активности альбумина, с помощью методов ЯМР мы изучили взаимодействие БСА с НФП. По данным ЯМР-спектроскопии, БСА обладает истинно эстеразной активностью и по отношению к НФП (рисунок 3.4). В течение примерно 90 минут наблюдения усиливаются сигналы  $\mathbf{a}_1'$  (0.98 ppm),  $\mathbf{a}_2'$  (2.11 ppm),  $\mathbf{b}'$  (6.65 ppm) и  $\mathbf{c}'$  (7.90 ppm), соответствующие продуктам эстеразной реакции, и ослабевают сигналы  $\mathbf{a}_1$  (1.10 ppm),  $\mathbf{b}$  (7.25 ppm) и  $\mathbf{c}$  (8.20 ppm), соответствующие сигналам молекулы НФП. Сигнал  $\mathbf{a}_2$ , соответствующий  $\text{CH}_2$ -группе НФП, не виден на спектре, поскольку, по всей видимости, перекрывается сигналом БСА или DMSO.



**Рисунок 3.4** – Кинетика гидролиза *n*-нитрофенилпропионата (НФП) в присутствии БСА. А – полный спектр; Б – ароматическая область спектра; В – сигналы  $\text{CH}_3$ -группы в составе НФП (слева) и пропионата (справа); Г – сигнал  $\text{CH}_2$ -группы пропионата. DSS – внутренний стандарт триметилсилилпропансульфонат натрия; DMSO – диметилсульфоксид.

Изменения соответствующих сигналов НФП и продуктов его гидролиза в отсутствие БСА (спонтанный гидролиз) представлены на рисунке 3.5. Как и в случае НФА, скорость спонтанного гидролиза НФП ниже, чем в присутствии БСА, что дополнительно подтверждает наличие истинно эстеразной активности у СА в сайте, отличном от сайта псевдоэстеразной активности Садлоу II.



**Рисунок 3.5** – Кинетика спонтанного гидролиза НФП по данным ЯМР: ароматическая часть спектра (вверху) и алифатическая части спектра (в центре и внизу). DMSO – диметилсульфоксид

Для того, чтобы убедиться, что эстеразная активность альбумина принадлежит именно альбумину, а не примесным белкам, мы провели

электрофорез препарата БСА, использованного в данной работе. Результат представлен на рисунке 3.6. Как видно из рисунка 3.6, на двух последних дорожках в эксперименте без добавления ДТТ с максимальной нагрузкой (10 и 15 мкл раствора с концентрацией 4мг/мл БСА соответственно, а именно 40 и 60 мкг белка), обнаружены примесные белки (отмечено красным). Предел обнаружения для использовавшегося красителя (бромфеноловый синий) составляет порядка 8 нг белка. Если принять, что на дорожке №6 присутствуют две примеси примерно по 10 нг каждая, то относительное содержание каждой примеси составляет примерно 0.025%.



**Рисунок 3.6** – Результат электрофореза препарата БСА (Sigma Aldrich) без добавления ДТТ (дорожки 3-7) и с добавлением ДТТ (дорожки 9-13). Концентрация раствора БСА составляла 4мг/мл. На дорожку 1 наносили 3 мкл BLUelf Prestained Protein Ladder (GeneDirex). На дорожки 3-7 и 9-13 наносили 1, 2, 5, 10 и 15 мкл раствора БСА, соответственно. Зеленым цветом отмечены мономеры альбумина и его агрегаты (димеры, тетрамеры). Красным цветом отмечены примесные белки.

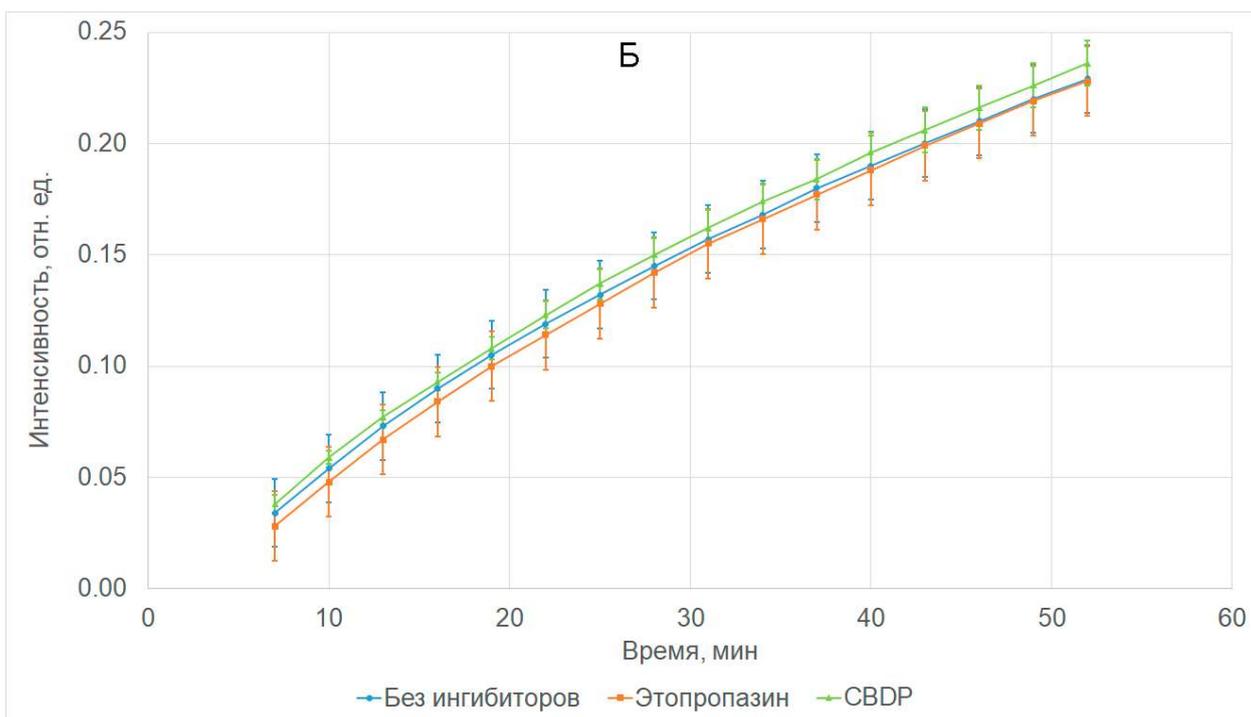
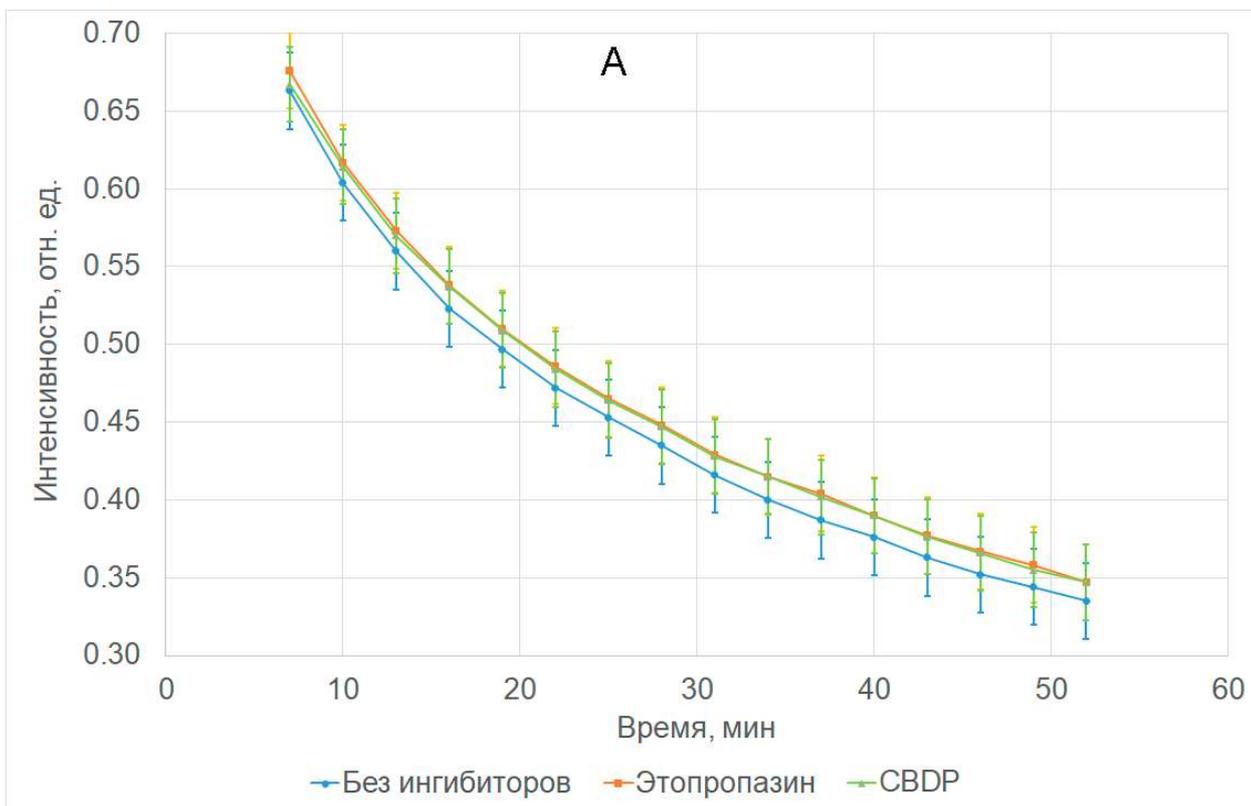
Помимо альбумина, в плазме крови гидролиз НФА могут осуществлять эстеразы бутирилхолинэстераза (БХЭ) и КЭ. Активность параоксоназы PON1, АХЭ и нейротоксичной эстеразы (НТЭ) мы исключили, поскольку PON1 не активна в

бескальциевой среде, эритроцитарная АХЭ связана с мембранами эритроцитов, а НТЭ – с мембранами лимфоцитов и тромбоцитов. В плазме крови присутствует и мономерная (несплайсированная) АХЭ, но у быка и человека в норме ее очень мало, примерно 8 мкг/л, что на 7 порядков меньше концентрации альбумина. Для того, чтобы убедиться, что примесные белки не вносят вклад в эстеразную активность БСА, методом ЯМР мы проанализировали гидролиз НФА под действием БСА в присутствии этопропазина и СВDP – ингибиторов БХЭ и КЭ, соответственно.

Концентрация БСА в эксперименте составляла 360 мкМ. Известно, что в плазме крови человека и быка концентрация БХЭ в 10000 (на 4 порядка) меньше концентрации альбумина, а концентрация КЭ – как минимум в 100000 раз (на 5 порядков) меньше. Таким образом, даже в плохо очищенном препарате БСА с концентрацией 360 мкМ концентрация БХЭ составляет максимум 36 нМ, а концентрация КЭ – максимум 3.6 нМ. В представленном эксперименте концентрации добавленных к образцам БСА ингибиторов составляли 240нМ и 24 нМ для этопропазина и СВDP, соответственно. То есть, соотношение с концентрациями потенциальных эстераз составляло минимум 6:1.

Эксперимент повторяли трижды. Результат представлен на рисунке 3.7. Была построена зависимость относительной интегральной интенсивности сигналов метильной группы НФА (рисунок 3.7А) и свободной ацетатной группы (рисунок 3.7Б) от времени. Интенсивность сигналов субстрата и продукта реакции рассчитывали относительно интегральной интенсивности сигнала внутреннего стандарта DMSO. Значения интенсивностей представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

Процесс работы спектрометра таков, что между добавлением субстрата к ферменту и снятием первого спектра проходит около 7-10 минут. К этому моменту сайты Садлоу II молекул БСА уже полностью ацетилированы [64, 99], поэтому полученные спектры отображают кинетику исключительно истинно эстеразной реакции альбумина.



**Рисунок 3.7** – Зависимость относительной интегральной интенсивности ( $I_{rel}$ ) сигнала метильной группы НФА (А) и свободной ацетатной группы (Б) в реакционной смеси в присутствии БСА и ингибиторов БХЭ и КЭ.  $I_{rel}$  рассчитывали как отношение интегральной интенсивности сигнала субстрата или продукта к интегральной интенсивности сигнала внутреннего стандарта DMSO.

Установлено, что ингибиторы КЭ и БХЭ не влияют на скорость убыли субстрата и скорость прироста продукта эстеразной реакции. На основании полученных данных мы заключили, что гидролиз НФА в присутствии БСА осуществляется именно альбумином, а не примесными белками. Мы полагаем, что примеси препарата могут быть глобулинами.

На следующем шаге с помощью методов молекулярного моделирования мы попытались выявить сайт истинно эстеразной активности альбумина.

### **3.2. Поиск возможных сайтов истинно эстеразной активности БСА методами молекулярного моделирования**

Как уже было отмечено выше, в альбумине существует три основных лиганд-связывающих центра: сайт Садлоу I, сайт Садлоу II и сайт III. Согласно многочисленным данным, сайт Садлоу II с каталитическим тирозином Tyr411 является сайтом псевдоэстеразной активности белка, следовательно, ферментативный гидролиз НФА может происходить в сайтах Садлоу I и III. Логично предположить, что аминокислотный остаток, ответственный за каталитическую реакцию, не должен совпадать с теми остатками, что оказались практически необратимо ацетилированы в исследовании группы Локридж [99]. Таким образом, исключаются все лизины, остаются серины, треонины и тирозины.

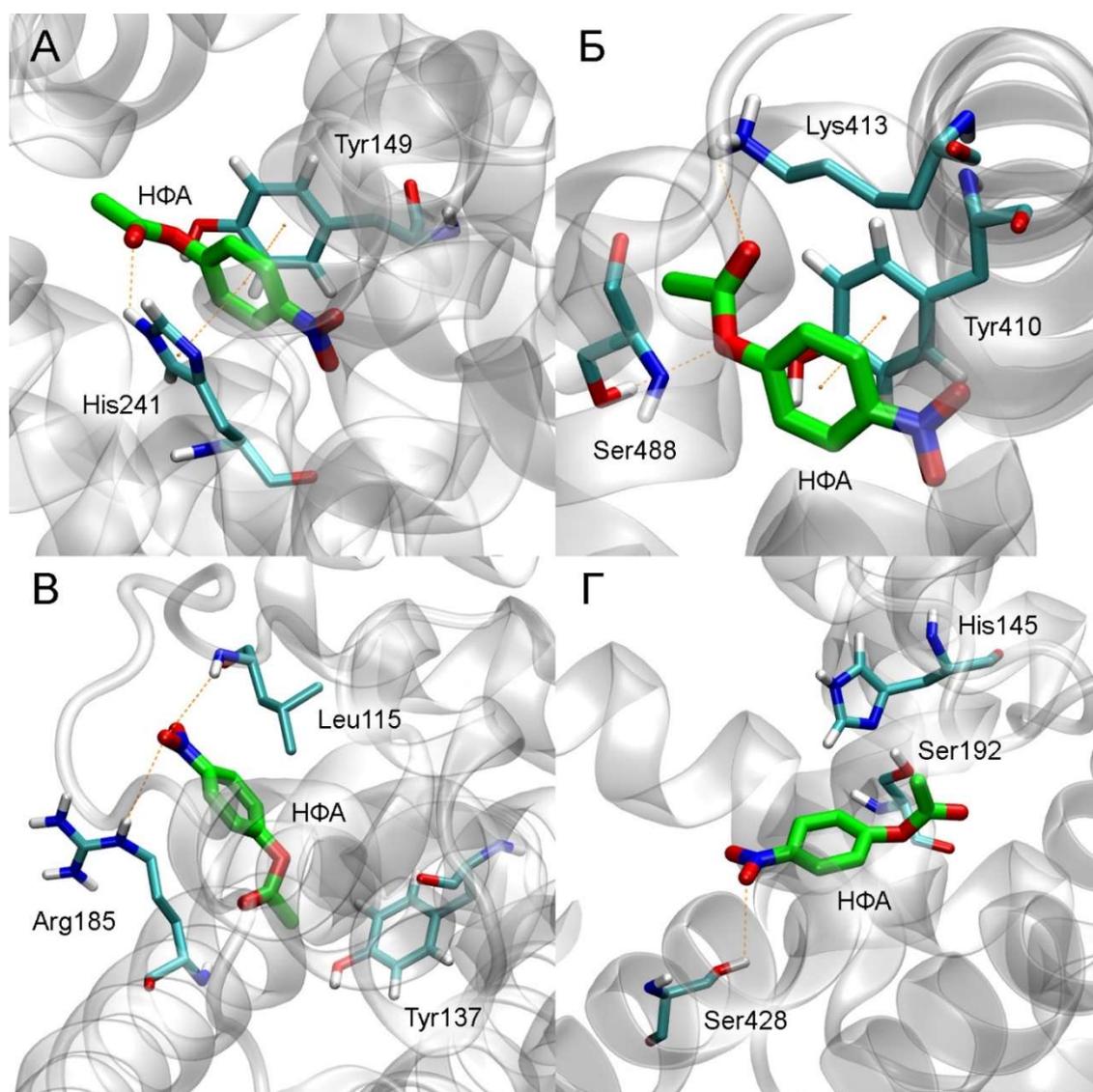
Известны кристаллические структуры комплексов альбумина человека с варфарином в сайте Садлоу I (код структуры 2bxd) и 4Z,15E-bilirubin-IXalpha в сайте III (код структуры 2vue). Анализ окружения этих лигандов выявил Tyr150 и Ser287 в сайте Садлоу I, а также Tyr138, Tyr161 и Ser193 в сайте III. Из этих аминокислот Ser287 и Tyr161 являются сайтами необратимого ацетилирования, тогда как аддукты с Tyr150, Tyr138 и Ser193 не были выявлены методом MALDI-TOF [99]. Эти три остатка и являются основными кандидатами на роль каталитических остатков, отвечающих за истинно эстеразную активность альбумина.

Аминокислотам Tyr138, Tyr150, Ser193 и Tyr411 в ЧСА соответствуют Tyr137, Tyr149, Ser192 и Tyr410 в БСА. На следующем этапе мы провели молекулярный докинг молекулы НФА в предполагаемые центры эстеразной активности БСА, а также в сайт псевдоэстеразной активности белка (Садлоу II). Поскольку ключевым фактором для возможности прохождения эстеразной реакции является в первую очередь геометрия продуктивного комплекса, из всех найденных конформаций комплекса белок-лиганд мы отбирали конформацию с минимальным расстоянием между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты (distC-O). Для всех четырех исследуемых центров связывания была выявлена такая конформация НФА, в которой он находится в непосредственной близости от каталитической аминокислоты (рисунок 3.8).

В сайте Садлоу I НФА связывается таким образом, что бензольное кольцо лиганда образует стэкинг-взаимодействие с ароматическими боковыми радикалами Tyr149 и His242, а карбоксильный кислород образует водородную связь с атомом водорода имидазольного кольца His242 (рисунок 3.8А). В сайте Садлоу II бензольное кольцо НФА образует стэкинг-взаимодействие с бензольным кольцом Tyr410, карбоксильный кислород – водородную связь с одним из водородов NH<sub>3</sub>-группы Lys413, а эфирный кислород – водородную связь с гидроксильной группой Ser488 (рисунок 3.8Б). В сайте Tyr137 атом кислорода нитрогруппы НФА образует водородные связи с боковым радикалом Arg185 и водородом остова Leu115 (рисунок 3.8В). В сайте Ser192 нитрогруппа НФА образует водородную связь с гидроксильной группой Ser428 (рисунок 3.8Г).

На следующем этапе стабильность полученных комплексов была проверена методом молекулярной динамики. Зависимость значений distC-O от времени представлена на рисунке (рисунок 3.9). Согласно полученным данным лишь комплекс НФА с сайтом Садлоу II остается стабильным в течение 10 нс (рисунок 3.9Б), что в очередной раз подтверждает высокую реактивность Tyr410 (Tyr411 в ЧСА). Это первая аминокислота, с которой взаимодействует НФА, а стабильность

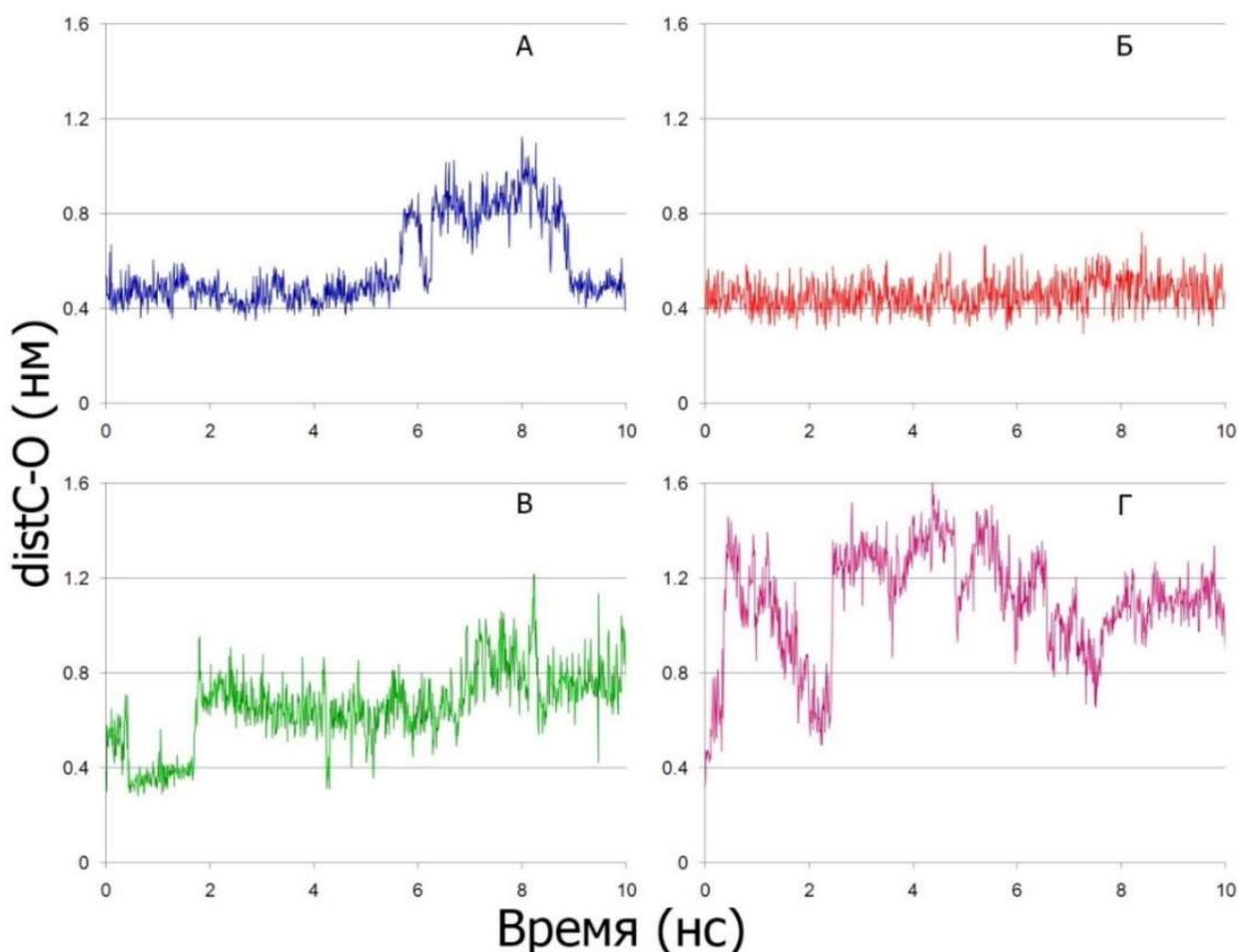
продуктивной конформации способствует быстрому (относительно других аминокислот альбумина) протеканию реакции ацетилирования.



**Рисунок 3.8** – Результат молекулярного докинга НФА в лиганд-связывающие сайты БСА: сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149 (А), сайт Садлоу II с каталитическим Tyr410 (Б), сайт III с каталитическим Tyr137 (В) и с каталитическим Ser192 (Г)

Что касается сайта Садлоу I, согласно полученным данным, бóльшую часть времени ориентация НФА относительно аминокислот сайта остаётся неизменной (рисунок 3.9А). Исключение составил лишь небольшой период симуляции (с 6 по

9 нс), но затем молекула лиганда возвращается в исходную конформацию между аминокислотными остатками Tyr149 и His241.



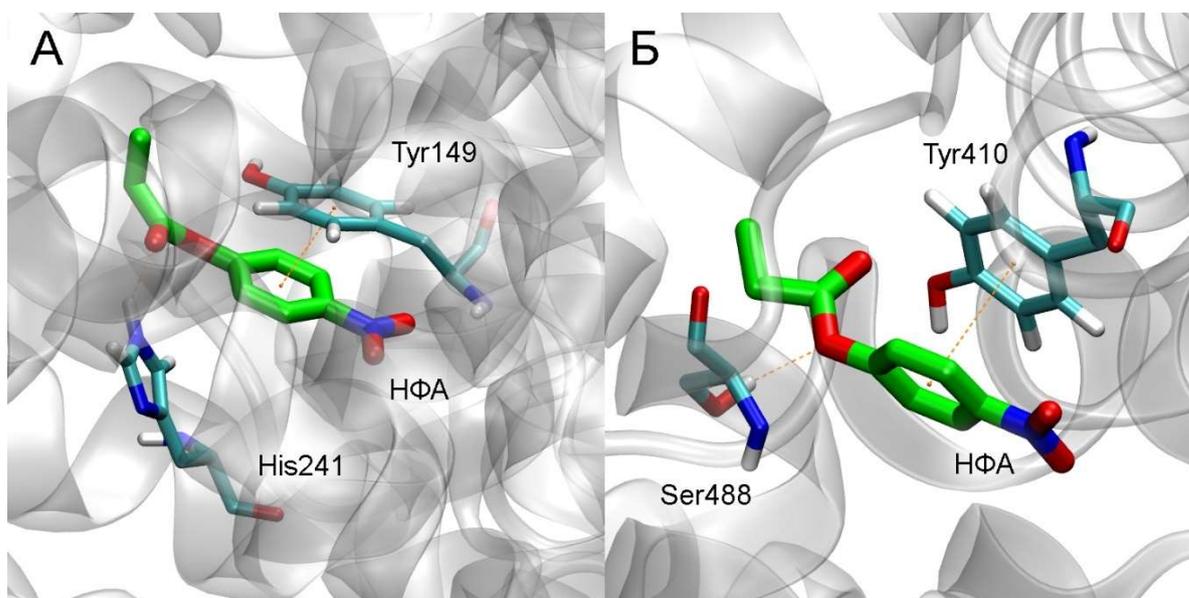
**Рисунок 3.9** – Зависимость от времени расстояния между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты в сайте псевдоэстеразной активности и предполагаемых сайтах эстеразной активности альбумина быка (distC-O). (А) сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, (Б) сайт Садлоу II с каталитическим Tyr411, (В) сайт III с каталитическим Tyr137, (Г) сайт III с каталитическим Ser192.

В случае Tyr137 (рисунок 3.9В), молекула НФА некоторое время остается в сайте, затем покидает его, и финальную часть симуляции взаимодействует с Lys187, одним из возможных сайтов необратимого ацетилирования. В случае Ser192 (рисунок 3.9Г) молекула НФА сразу покидает сайт связывания и

приближается к аминокислотному остатку Lys431 на поверхности белка, который также является сайтом необратимого ацетилирования.

Таким образом, по всей видимости, Ser192 (Ser193 в ЧСА) не является основным сайтом эстеразной активности альбумина. В пользу этого предположения говорит тот факт, что в молекуле КСА Ser192(193) заменен на аланин, тогда как КСА и ЧСА показывают схожую кинетику гидролиза НФА – быстрый всплеск активности и затем переход в стационарный режим [64]. В случае Tyr137 (Tyr138 в ЧСА) молекула НФА также быстро покидает активный центр, и мы полагаем, что эта аминокислота не принимает участие в эстеразной активности белка (по крайней мере, не является основным сайтом). В ближайшем окружении Tyr137 нет аминокислот, способных оттянуть на себя протон каталитического тирозина, в отличие от сайта Садлоу I, где поблизости от Tyr149 присутствуют His241 и His287 (His242 и His288 в ЧСА). В предыдущих исследованиях мы изучали кинетику выхода нитрофенола при взаимодействии альбуминов разных видов с НФА и показали, что варфарин (специфический лиганд сайта Садлоу I) ингибирует отдаленную стадию гидролиза НФА альбумином [64]. На основании совокупности всех этих данных, мы полагаем, что именно сайт Садлоу I с каталитическим Tyr149 (Tyr150 в ЧСА) является сайтом эстеразной активности альбумина.

В заключение поиска сайта эстеразной активности альбумина мы провели молекулярный докинг молекулы НФП в сайты Садлоу I и Садлоу II БСА, который выявил, что лиганд связывается в этих сайтах в конфигурации, близкой к положению молекулы НФА (рисунок 3.10). В случае сайта Садлоу I (рисунок 3.10А), значение  $\text{dist}_{C-O}$  составляет 0.30 нм, а в случае Сайта Садлоу II (рисунок 3.10Б) – 0.38 нм. Полученный результат ожидаемо указывает на схожий механизм взаимодействия БСА с НФА и НФП.



**Рисунок 3.10** – Результат молекулярного НФП в лиганд-связывающие сайты альбумина быка (БСА). А – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, Б – сайт Садлоу II с каталитическим Tyr411.

### 3.3. Влияние окисления тиоловой группы Cys34 на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина по отношению к НФА

Известно, что единственная свободная тиоловая группа в составе молекулы альбумина (Cys34), способна образовывать дисульфиды со свободным цистеином и другими тиолами, или окисляться до сульфеновой (Cys34-SOH) или сулфиновой (Cys34-S(O)O<sup>-</sup>) кислоты [66]. Мы предполагаем, что окисление альбумина может влиять на его связывающие и эстеразные свойства. Поскольку окисление всегда связано с изменением распределения зарядов и стерических взаимодействий, нельзя исключать, что геометрия сайтов связывания альбумина меняется после окисления, что может повлиять на его функциональные свойства. Данные о влиянии окисления на активность альбумина, полученные в более ранних работах, носят противоречивый характер. Биохимическими методами и методами молекулярного моделирования мы изучили влияние степени окисления тиоловой группы Cys34 альбуминов человека и быка на их связывающую и гидролитическую активность.

### *3.3.1. Влияние восстановления тиоловой группы БСА на его связывающие и эстеразные свойства по отношению к НФА в эксперименте in vitro*

На первом этапе было проведено сравнение функциональных характеристик коммерческого БСА (частично окисленного) и восстановленного БСА по отношению к НФА. Для определения оптимальной концентрации восстановителя была изучена зависимость оптической плотности раствора БСА от количества добавленного ДТТ (таблица 3.1). В работе [60] было подобрано оптимальное соотношение ЧСА-ДТТ, при котором восстанавливалось максимальное количество Cys-34 и при этом не восстанавливались внутримолекулярные дисульфидные связи. Опираясь на опубликованные данные, в своей работе с БСА мы исследовали такой же диапазон молярных соотношений ЧСА-ДТТ – от 1:1 до 1:10. По уравнению калибровочного графика из значения оптической плотности была рассчитана концентрация свободных тиоловых групп в восстановленном белке (таблица 3.1).

Полученные данные указывают на то, что на одну молекулу коммерческого БСА (не подвергшегося действию ДТТ) приходится 0.42 свободной тиоловой группы, то есть в образце БСА только 42% процентов белка находится в восстановленном состоянии, а 58% – в окисленном. Полученный результат в целом согласуется с литературными данными: в разных образцах процент меркаптоальбумина (альбумина с восстановленной формой Cys34) варьировал от 12.6% до 48.03% [24, 115, 149].

Трехкратного избытка ДТТ по отношению к БСА, так же, как и в работе [60], оказалось достаточно для восстановления максимального количества Cys-34, это соотношение и было использовано в дальнейшем для изучения влияния окисления тиоловой группы на функциональные свойства альбумина. Возникновение дополнительных 0.27 частей свободных тиоловых групп, по всей видимости, связано с невозможностью полностью отфильтровать ДТТ после восстановления тиоловой группы Cys34.

**Таблица 3.1** – Количество свободных тиоловых групп в растворе БСА после восстановления ДТТ в разных соотношениях.

Соотношение ДТТ-БСА	ДТТ, мкМ	Количество свободных тиоловых групп на молекулу альбумина
10:1	144.9	1.46
6:1	86.9	1.40
3:1	43.5	1.27
1:1	14.5	0.75
0:1	0	0.42

Кинетические характеристики коммерческого и восстановленного БСА приведены в таблице 3.2. Согласно полученным экспериментальным данным, для первой стадии гидролиза  $V_{\max}$  практически не зависит от степени окисления белка, тогда как значение  $K_M$  уменьшается после восстановления свободных тиоловых групп (соответственно, значение  $K_M$  возрастает после окисления). Таким образом, окисление замедляет псевдоэстеразную активность в сайте Садлоу II БСА по отношению к НФА. В случае второй стадии, с окислением уменьшается значение  $K_M$  (т.е. возрастает сродство), но более в чем два раза уменьшается значение  $V_{\max}$ . Следовательно, субстрат более прочно связывается с белком, но при этом не гидролизуется, что означает замедление истинно эстеразной активности в сайте Садлоу I.

**Таблица 3.2** – Кинетические характеристики восстановленного и коммерческого БСА

	1 стадия (сайт Садлоу II)		2 стадия (сайт Садлоу I)	
	$K_M$ , мкМ	$V_{\max}$ , мкмоль/мин*л	$K_M$ , мкМ	$V_{\max}$ , мкмоль/мин*л
БСА восстановленный	75.8±10.2	2.8±0.1	362.6±70.7	5.3±0.7
БСА коммерческий (частично окисленный)	140.5±29.7 *	2.3±0.2	195.3±35.7 *	2.1±0.2 *

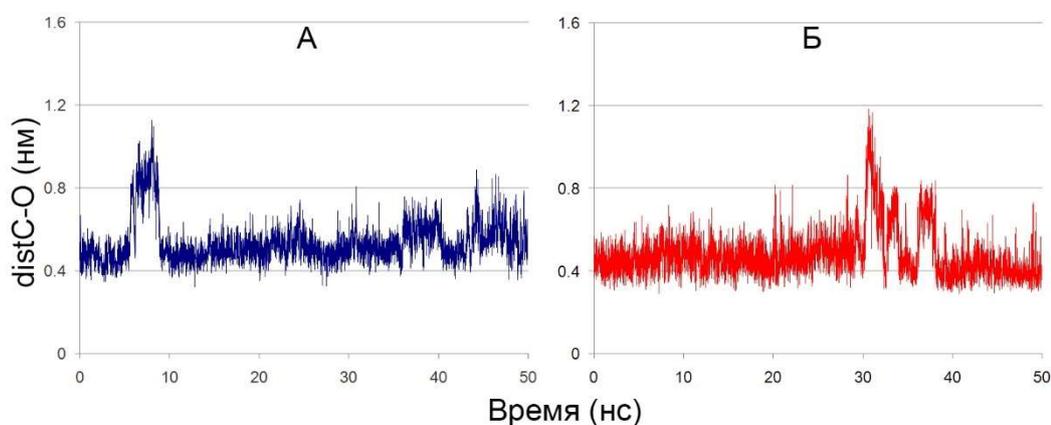
\* –  $p < 0.05$

### 3.3.2. Влияние цистеинилирования тиоловой группы БСА на его связывающие и эстеразные свойства по отношению к НФА в эксперименте *in silico*

Согласно литературным данным [77], цистеинилированный альбумин является мажорной формой окисленного белка, поэтому в нашем исследовании мы изучили, как цистеинилирование Cys34 влияет на взаимодействие БСА с НФА.

На первом этапе мы изучили взаимодействие НФА с сайтами Садлоу I и Садлоу II нативного БСА (меркапто-БСА, мБСА) методом молекулярной динамики на более длинном промежутке времени (50 нс). По полученным траекториям была построена зависимость значения  $\text{distC-O}$  от времени (рисунок 3.11).

Согласно полученным данным, ориентация НФА относительно аминокислот сайта Садлоу I мБСА остаётся практически неизменной. Исключение составил лишь небольшой период (с 7 по 10 нс, рисунок 3.11А). В промежутке 10-15 нс конформация НФА в сайте Садлоу I мБСА максимально стабильна, значение  $\text{distC-O}$  при этом минимально. Молекула НФА остаётся «зажатой» аминокислотными остатками Tyr149 и His241.



**Рисунок 3.11** — Зависимость от времени расстояния между атомом карбоксильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода каталитического тирозина нативного БСА ( $\text{distC-O}$ ). А – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, Б – сайт Садлоу II с каталитическим Tyr410.

В случае Сайта Садлоу II, молекула НФА может находиться в сайте Садлоу II мБСА в двух конформациях (промежутки 0-25 нс и 40-50 нс), а в промежутке 30-40 нс происходит конформационный переход (рисунок 3.11Б). Конформации различаются положением нитрогруппы. В первой конформации нитрогруппа взаимодействует с имидазольным кольцом His463 и остовом остатков Leu422 и Val455. Во второй конформации NO<sub>2</sub>-группа расположена вблизи остова остатков Ile387 и Leu386 и бокового радикала Asn390. В обеих конформациях значение distC-O колеблется в районе 0.4 нм.

Таким образом, согласно полученным графикам, молекула НФА остается внутри сайтов Садлоу I и Садлоу II мБСА на протяжении всего периода симуляции, однако позиция лиганда возле Tyr411 стабильнее и более предпочтительна для нуклеофильной атаки гидроксильной группы каталитического тирозина на карбоксильный атом углерода НФА. В целом это согласуется с нашими предыдущими биохимическими экспериментами, которые указывают на то, что каталитическая эффективность сайта Садлоу I БСА ниже активности сайта Садлоу II [64].

Интересно отметить роль His241 во взаимодействии НФА с сайтом Садлоу I. Можно было бы предположить, что гистидин играет роль, схожую с ролью гистидина каталитической триады сериновых гидролаз, а именно оттягивает на себя протон Tyr149. Однако согласно данным молекулярной динамики, роль His241 состоит скорее в стабилизации положения НФА в сайте Садлоу I: на протяжении 50 нс симуляции среднее расстояние между карбоксильным атомом НФА и Hε2 гистидина составляет 0.34 нм, тогда как расстояние между водородом гидроксильной группы Tyr149 и атомом Nδ1 гистидина – 1.02 нм. То есть, по крайней мере в случае гидролиза НФА, His241 играет роль оксианионного центра. В наших предыдущих исследованиях мы моделировали взаимодействие параоксона с сайтом Садлоу I альбумина человека и быка, и согласно полученным данным, гидроксил Tyr150 имел тенденцию взаимодействовать с имидазольным кольцом гистидина His242. Но при этом параоксон в первые же шаги молекулярной динамики практически сразу отдалялся от Tyr150 [26, 63]. Интересно, что согласно

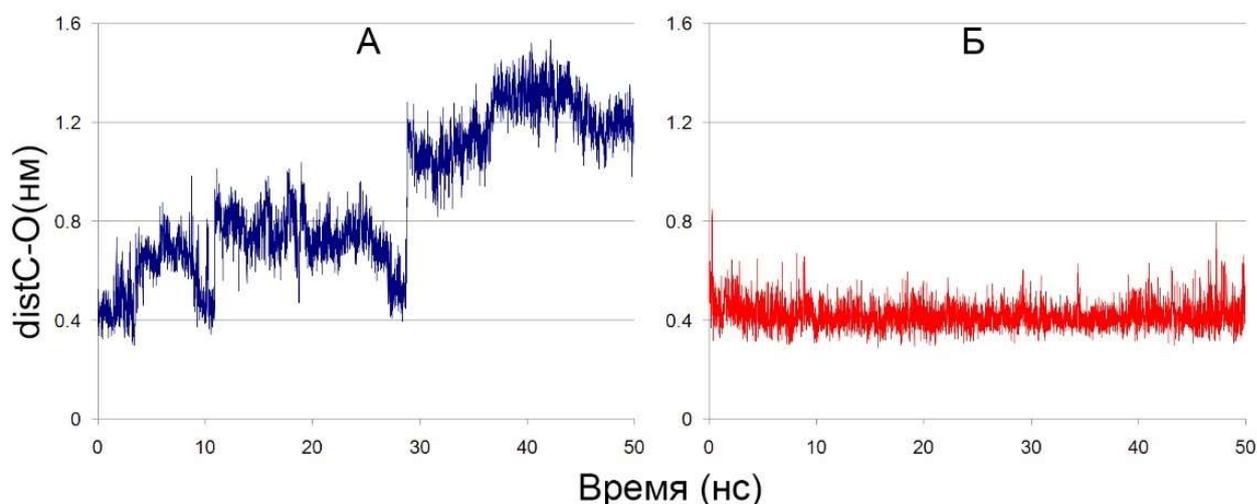
биохимическим данным, варфарин (специфический ингибитор сайта Садлоу I) ингибировал отдаленную стадию альбумин-катализируемого гидролиза НФА, но не параоксона [64]. Роль оттягивателя протона в случае взаимодействия НФА с сайтом Садлоу I может играть Asp258: за 50 нс симуляции расстояние между кислородом бокового радикала Asp258 и атомом водорода гидроксильной группы Tyr150 снижается с 1.3 нм в начальной точке траектории до 0.2-0.5 нм в последние 10 нс траектории.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о важной роли Arg409 (Arg410 в ЧСА) в псевдокаталитической активности альбумина в сайте Садлоу II. Высказано предположение, что Arg410 выполняет роль оксианионного центра, образуя водородную связь с карбонильной группой субстрата [134]. Однако согласно полученным нами данным, молекула НФА не взаимодействует с Arg409 на протяжении 50 нс симуляции. Аналогичный результат мы получили при моделировании взаимодействия параоксона с сайтом Садлоу II альбуминов человека и быка [26, 63]. Поскольку альбумин не является классическим ферментом, а реакция гидролиза протекает медленно (по сравнению с той же АХЭ, для которой необходима жесткая фиксация ацетилхолина), мы полагаем, что, возможно, существует несколько продуктивных конформаций субстрата, в которых возможна атака гидроксильной группы тирозина на карбонильный углерод. Но в любом случае, Arg409, по всей видимости, необходим для закрепления субстрата на входе в сайт Садлоу II. Как бы то ни было, согласно полученным нами данным, сайт Садлоу II является самым предпочтительным сайтом для НФА, а Tyr410 – самой реактивной аминокислотой, что согласуется с литературными данными. Взаимодействие НФА с другими сайтами возможно только после полного ацетилирования Сайта Садлоу II.

Далее мы изучили взаимодействие НФА с сайтами Садлоу I и Садлоу II цистеинилированного cysБСА. Подготовка цистеинилированной модели БСА описана в разделе 2.7.1. Поскольку структуры сайтов Садлоу I и Садлоу II в подготовленных моделях восстановленного и окисленного БСА идентичны

(изменения в структуре затронули лишь Cys34 и его окружение), отдельно молекулярный докинг НФА в cysБСА не проводили. Для молекулярной динамики использовали те же стартовые координаты лиганда, которые были получены в результате молекулярного докинга НФА в сайты Садлоу восстановленного БСА. Зависимость  $\text{distC-O}$  от времени по данным МД представлена на рисунке 3.12.

В случае сайта Садлоу I (рисунок 3.12А), молекула НФА остается возле каталитического тирозина только в течение 5 нс, затем лиганд отдалеяется, а после 30 нс переходит в другую часть сайта Садлоу I и сближается с аминокислотными остатками Arg198, Arg194, Arg217, формирующими вход в сайт Садлоу I. При этом, после отдаления НФА от Tyr149 происходит его сближение с имидазольным кольцом His241, а взаимодействия тирозина с Asp258 (как в случае восстановленного БСА) не происходит. В промежутке 0-5 нс конформация НФА в сайте Садлоу I cysБСА максимально стабильна, значение  $\text{distC-O}$  при этом минимально.



**Рисунок 3.12** – Зависимость от времени расстояния между атомом карбоксильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода каталитического тирозина цистеинилированного БСА ( $\text{distC-O}$ ). А – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, Б – сайт Садлоу II с каталитическим Tyr410.

В случае сайта Садлоу II (рисунок 3.12Б), молекула НФА остается в одной и той же конформации на протяжении всей траектории, нитрогруппа лиганда при этом взаимодействует с имидазольным кольцом His463 и остовом остатков Leu422 и Val455. Положение лиганда внутри сайта Садлоу II даже более стабильно, чем в случае восстановленного белка. Схожий эффект мы получили при моделировании взаимодействия параоксона с сайтом Садлоу II ЧСА с разной степенью окисления тиоловой группы [26].

Чтобы понять, как цистенилирование редокс-сайта БСА влияет на связывание НФА с сайтом Садлоу I, мы проанализировали сеть взаимодействий между сайтами. Для анализа использовали конформации белок-лиганд после 50 нс симуляции МД. Согласно полученным данным, окисленный Cys34 теряет водородную связь с His39. «Вакантное место» занимает Ser28, гидроксильная группа которого в окисленном альбумине образует водородную связь с имидазольным кольцом His39, при этом также разрушается водородная связь между Tyr139 и His39. Сближение Ser28 и His39 приводит к тому, что триада аминокислот Tyr147-Phe148-Tyr149 смещается по направлению к паре Ser28-Gln29, Tyr149 сайта Садлоу I «утягивает» за собой His242 сайта Садлоу I, конфигурация сайта меняется, и молекула НФА отдалается от каталитического Tyr149.

Таким образом, согласно данным *in silico*, окисление тиоловой группы Cys34 альбумина слабо влияет на взаимодействие НФА с сайтом Садлоу II. Садлоу I более подвержен аллостерической модуляции.

#### **3.4. Влияние окисления тиоловой группы ЧСА и БСА на их связывающие и эстеразные свойства по отношению к параоксону в эксперименте *in silico***

Методами молекулярного моделирования мы изучили, как степень окисления Cys34 влияет на связывающую и ферментативную активность ЧСА и БСА по отношению к параоксону.

### 3.4.1. Подготовка трехмерных моделей ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34

Были подготовлены 12 моделей альбумина, соответствующие разной степени окисления Cys34 ЧСА и БСА и разной занятости сайтов Садлоу I и Садлоу II параоксоном (таблица 3.3).

Модели ЧСА0-I, ЧСА0-II, БСА0-I и БСА0-II соответствует неокисленной форме цистеина Cys34. Константа диссоциации кислоты бокового радикала цистеина в логарифмической шкале (pKa) составляет примерно 8.5 [122], поэтому в диапазоне физиологических значений pH (7.2-7.4) атом серы будет преимущественно протонирован: Cys34-SH.

**Таблица 3.3** – Условные обозначения трёхмерных моделей ЧСА и БСА в зависимости от степени окисления тиоловой группы Cys34 и занятости сайтов Садлоу I и Садлоу II параоксоном.

<b>ЧСА</b>		
	<b>Параоксон в сайте Садлоу I</b>	<b>Параоксон в сайте Садлоу II</b>
<b>Cys34-SH</b>	ЧСА0-I	ЧСА0-II
<b>Cys34-SOH</b>	ЧСА1-I	ЧСА1-II
<b>Cys34-SOO<sup>-</sup></b>	ЧСА2-I	ЧСА2-II
<b>БСА</b>		
	<b>Параоксон в сайте Садлоу I</b>	<b>Параоксон в сайте Садлоу II</b>
<b>Cys34-SH</b>	БСА0-I	БСА0-II
<b>Cys34-SOH</b>	БСА1-I	БСА1-II
<b>Cys34-SOO<sup>-</sup></b>	БСА2-I	БСА2-II

Модели ЧСА1-I, ЧСА1-II, БСА1-I и БСА1-II соответствует первой стадии окисления цистеина – сульфеновой кислоте. Показано, что pKa сульфеновых кислот превышает 10 [17]. Согласно этому значению, гидроксильная группа сульфеновой кислоты Cys34 при нейтральных значениях pH будет

протонированной: Cys34-SOH. Вторая стадия окисления цистеина – сульфоновая кислота (модели ЧСА2-I, ЧСА2-II, БСА2-I и БСА2-II). Благодаря низкому значению  $pK_a$  (около 2) [17], в диапазоне физиологических значений pH сульфоновая кислота будет преимущественно депротонирована: Cys34-S(O)O<sup>-</sup>. Теоретически боковой радикал цистеина может необратимо окисляться и до сульфоновой кислоты (Cys34-S(O)O<sup>-</sup>O<sup>-</sup>). Однако, согласно литературным данным, процентное содержание Cys34 в виде сульфоновой кислоты в плазме крови крайне мало [66], поэтому эту степень окисления мы не рассматривали.

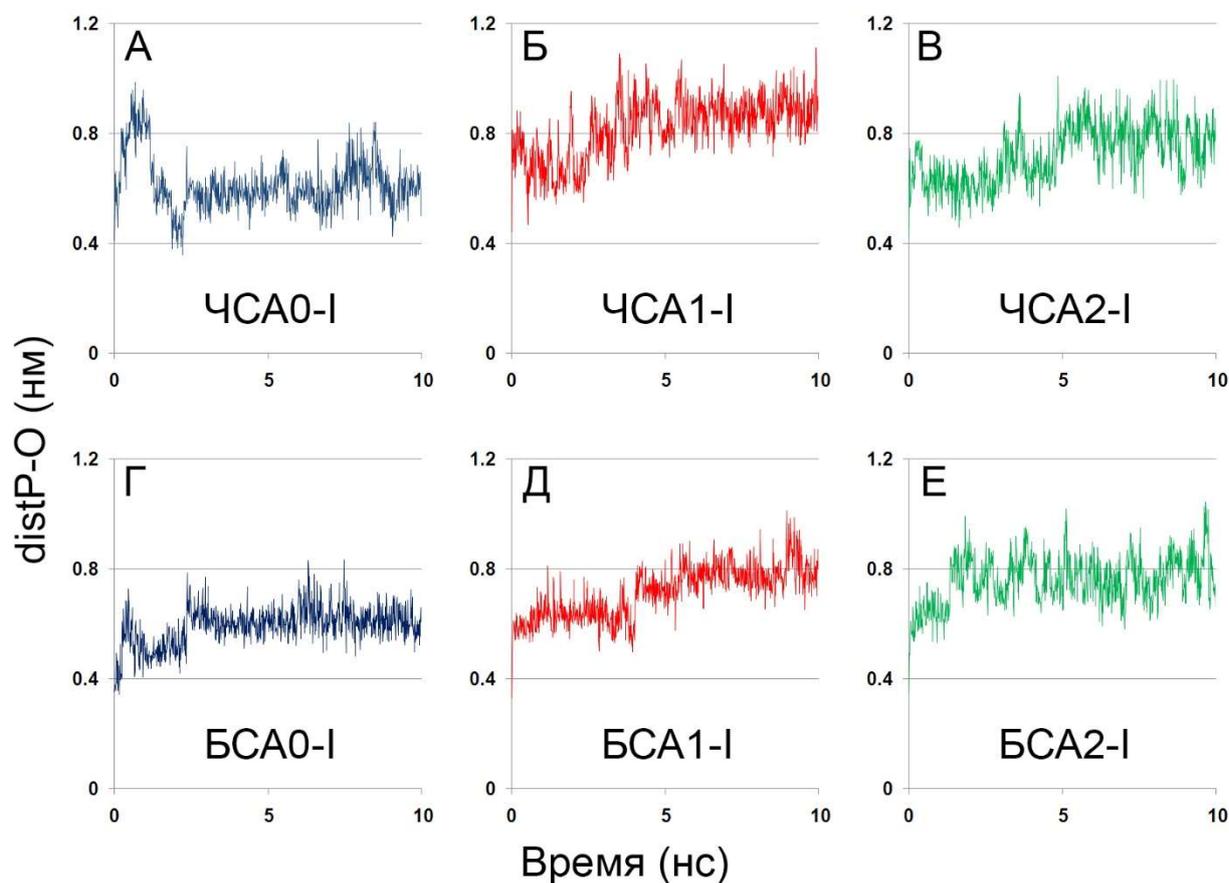
### 3.4.2. Сайт Садлоу I

На следующем этапе конформационные изменения полученных на предыдущем шаге моделей ЧСА1-I, ЧСА2-I, БСА1-I и БСА2-I (первая и вторая степени окисления ЧСА и БСА, параоксон в сайте Садлоу I) были изучены методом молекулярной динамики (10нс). Были рассчитаны зависимости от времени величин среднеквадратичных отклонений (root mean square deviation – RMSD) атомов C $\alpha$  молекулы альбумина от их начального положения. Значение RMSD для всех комплексов увеличивалось в течение первых 3-6 нс симуляции, затем выходило на плато и варьировало в диапазоне 0.4 – 0.5 нм, что указывает на стабилизацию полипептидной цепи молекулы альбумина.

По полученным траекториям были рассчитаны зависимости значений расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr150(Tyr149) (distP-O) от времени (рисунок 3.13). Этот параметр важен для оценки продуктивности полученного белок-лигандного комплекса. Для того чтобы могла произойти нуклеофильная атака кислорода каталитической аминокислоты на атом фосфора параоксона, значение distP-O должно составлять примерно 0.4 нм или меньше [80]. Во всех комплексах ЧСА и БСА с параоксоном, полученных нами методом молекулярного докинга, значение distP-O не превышало 0.4 нм.

Анализ полученных данных показал, что в сайте Садлоу I ЧСА и БСА продуктивный комплекс параоксона с альбумином (комплекс, в котором значение

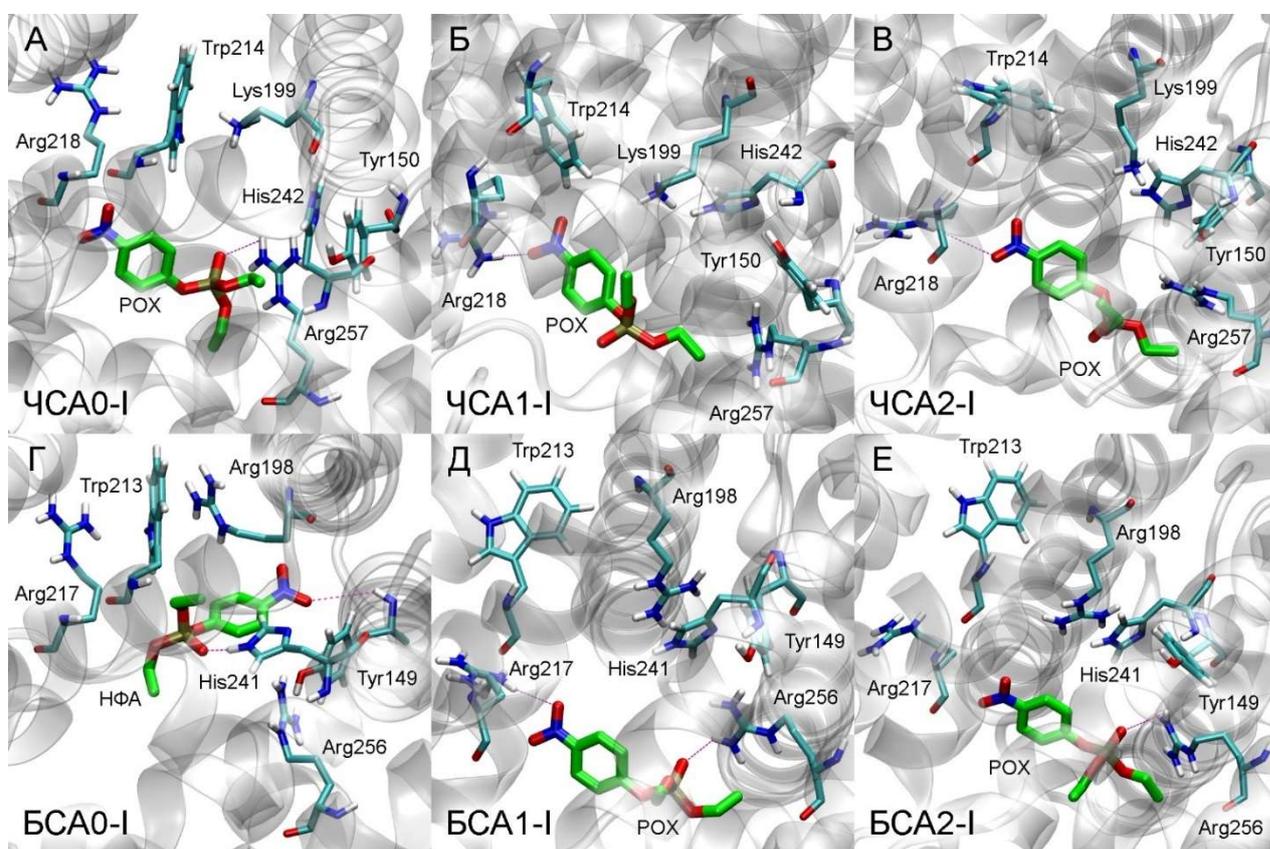
distP-O меньше 0.4 нм) нестабилен в независимости от степени окисления Cys34 (рисунок 3.13). Конформации комплексов в конечной точке траектории представлены на рисунке 3.14.



**Рисунок 3.13** – Зависимости от времени значений расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr150 (Tyr149) (distP-O) сайта Садлоу I ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты.

В модели ЧСА0-I значение distP-O первые 2 нс симуляции колеблется в промежутке 0.4-1.0 нм, затем оставшиеся 8 нс симуляции остается неизменным и колеблется на уровне 0.6 нм (рисунок 3.13А). Анализ положения молекулы

параоксона на этом участке траектории показал, что лиганд зафиксирован кулоновским взаимодействием между атомом фосфорильного кислорода параоксона и боковым радикалом аминокислотного остатка Arg257: в конечной конформации расстояние между фосфорильным атомом кислорода параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg257 составляет 0.36 нм (рисунок 3.14А). Нитрогруппа параоксона в этой устойчивой конформации расположена примерно на равном расстоянии между аминокислотами Arg218, Trp214 и Lys199. Значения расстояний между ближайшим к этим остаткам атомом кислорода NO<sub>2</sub>-группы лиганда и атомами Нε Arg218, Нε1 Trp214 и Нζ2 Lys199 варьирует в пределах 0.5-0.7 нм.



**Рисунок 3.14** – Устойчивые конформации параоксона (POX) в сайте Садлоу I ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты.

В модели ЧСА1-I значение  $\text{distP-O}$  увеличивается до 0.7 нм за 100 пс симуляции, затем остается неизменным и колеблется на уровне 0.7 нм в течение 4 нс, затем увеличивается до 0.9 нм и остается неизменным на протяжении оставшихся 6 нс (рисунок 3.13Б). Анализ положения молекулы параоксона показал, что в течение последних 6 нс симуляции лиганд зафиксирован электростатическим взаимодействием между группой  $\text{NO}_2$  параоксона и одной из  $\text{NH}_2$ -групп бокового радикала Arg218: в конечной конформации расстояние между атомом кислорода  $\text{NO}_2$ -группы параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg218 составляет 0.31 нм (рисунок 3.14Б). Положение фосфорной группы параоксона относительно Arg257 иное, чем в случае неокисленного цистеина: в конечной конформации траектории расстояние между фосфорильным атомом кислорода параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg257 составляет 0.88 нм.

В модели ЧСА2-I значение  $\text{distP-O}$  увеличивается до 0.7 нм за 100 пс симуляции, затем остается неизменным и колеблется на уровне 0.7 нм в течение 5 нс, затем увеличивается до 0.9 нм и остается неизменным на протяжении оставшихся 5 нс (рисунок 3.13В). В целом, динамика конформационных изменений молекулы параоксона и аминокислот сайта Садлоу I схожа в моделях ЧСА1-I и ЧСА2-I. Анализ положения молекулы параоксона на этом участке траектории показал, что группа  $\text{NO}_2$  параоксона «переключается» между боковыми радикалами Arg218 и Arg222. В конечной конформации расстояние между атомом кислорода  $\text{NO}_2$ -группы параоксона и атомом  $\text{H}\epsilon$  бокового радикала Arg218 составляет 0.49 нм (рисунок 3.14В). В течение 10 нс симуляции это расстояние варьирует от 0.35 до 0.97 нм. Расстояние между атомом кислорода  $\text{NO}_2$ -группы параоксона и атомом  $1\text{H}\eta 1$  в конечной конформации составляет 0.72 нм, а в течение симуляции варьирует от 0.21 до 0.84 нм. В конечной конформации расстояние между фосфорильным атомом кислорода параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg257 составляет 0.64 нм. В целом, в случае

сульфиновой кислоты параоксон более подвижен внутри сайта Садлоу I ЧСА, чем в случае восстановленного цистеина и сульфеновой кислоты.

В модели БСА0-I значение  $\text{distP-O}$  первые 3 нс симуляции колеблется в промежутке 0.4-0.8 нм, затем в течение 7 нс симуляции остается практически неизменным и колеблется на уровне 0.6 нм (рисунок 3.13Г). Анализ положения молекулы параоксона на этом участке траектории показал, что фосфорная группа лиганда зафиксирована кулоновским взаимодействием между атомом фосфорильного кислорода и боковым радикалом аминокислотного остатка His241. Расстояние между фосфорильным атомом кислорода параоксона и атомом водорода  $\text{H}\epsilon 2$  бокового радикала His241 колеблется в промежутке 0.2-0.4 нм, а в конечной конформации составляет 0.37 нм (рисунок 3.14Г).  $\text{NO}_2$ -группа параоксона в течение симуляции «переключается» между боковым радикалом Arg198 и  $\text{NH}$ -группой остова остатка Tyr149. Расстояние между одним из атомов кислорода нитрогруппы лиганда и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg198 колеблется в промежутке 0.3-0.5 нм, но затем возрастает и в конечной точке составляет 0.8 нм. Расстояние между этим же атомом нитрогруппы лиганда и водородом  $\text{NH}$ -группы остова Tyr149 колеблется в районе 0.3 нм, в конечной точке составляет 0.37 нм (рисунок 3.14Г).

В модели БСА1-I значение  $\text{distP-O}$  увеличивается до 0.6 нм за 100 пс симуляции, затем остается неизменным и колеблется на уровне 0.6 нм в течение 4 нс, затем увеличивается до 0.8 нм и остается неизменным на протяжении оставшихся 6 нс (рисунок 3.13Д). В течение последних 6 нс симуляции лиганд зафиксирован электростатическим взаимодействием между группой  $\text{NO}_2$  параоксона и одной из  $\text{NH}_2$ -групп бокового радикала Arg217. В конечной конформации расстояние между атомом кислорода  $\text{NO}_2$ -группы параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg217 составляет 0.37 нм (рисунок 3.14Д). Фосфорная группа параоксона на протяжении этих 6 нс взаимодействует с одной из  $\text{NH}_2$ -групп бокового радикала Arg256. В конечной конформации траектории расстояние между фосфорильным атомом кислорода

параоксона и ближайшим атомом водорода бокового радикала Arg256 составляет 0.37 нм (рисунок 3.14Д).

В модели БСА2-I значение  $\text{distP-O}$  увеличивается до 0.6 нм за 100 пс симуляции, затем остается неизменным и колеблется на уровне 0.6 нм в течение 1 нс, затем увеличивается до 0.8 нм и остается неизменным на протяжении оставшихся 8 нс (рисунок 3.13Е). Анализ траектории показал, что первые 1.5 нс положение фосфорной группы лиганда зафиксировано электростатическим взаимодействием между фосфорильным кислородом параоксона и атомом  $\text{N}\epsilon 2$  His241, расстояние между этими атомами в начале симуляции составляет 0.2 нм. В эти первые 1.5 нс  $\text{NO}_2$ -группа находится в тесном контакте с Arg217 и Arg198, атомы кислорода нитрогруппы взаимодействуют с боковыми радикалами этих аминокислот, расстояние колеблется в пределах 0.3-0.4 нм. Однако после 1.5 нс фосфорная группа параоксона отдаляется от всех аминокислот сайта Садлоу I. В конечной конформации расстояние между фосфорильным атомом кислорода параоксона и ближайшим полярным водородом (остаток Arg256) составляет 0.46 нм (рисунок 3.14Е). Нитрогруппа после 1.5 нс переключается на атом водорода  $\text{NH}$ -группы остова Leu218. Последние 8 нс симуляции расстояние между этим водородом и ближайшим атомом кислорода нитрогруппы лиганда колеблется в промежутке 0.3-0.4 нм, а в конечной конформации составляет 0.31 нм (рисунок 3.14Е).

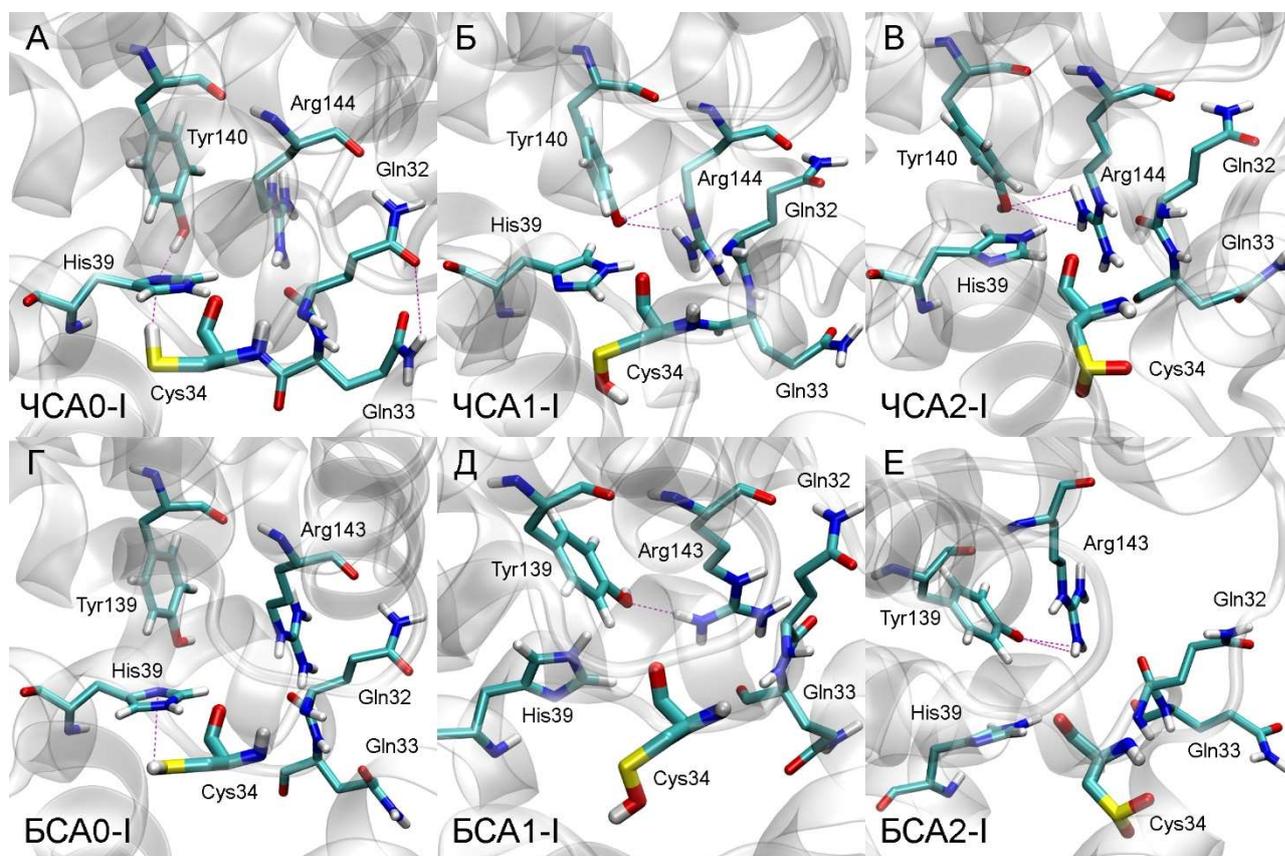
Как видно из рисунка 3.14, положение параоксона различно для всех трех моделей ЧСА, но следует отметить, что конформации сайта Садлоу I в моделях ЧСА1-I и ЧСА2-I более близки между собой (рисунки 3.14Б и 3.14В) по сравнению с ЧСА0-I (рисунок 3.14А). Основное различие модели ЧСА0-I от моделей ЧСА1-I и ЧСА2-I заключается в положении фосфорной группы параоксона относительно Arg257, а также в положении бокового радикала Arg222 относительно Arg218. Расстояния между атомами  $\text{C}\zeta$  Arg218 и 222 составляют 0.52, 0.95 и 0.81 нм в моделях ЧСА1-I, ЧСА2-I и ЧСА0-I соответственно.

Как и в случае ЧСА, положение параоксона различно для всех трех моделей БСА, и при этом конформации лиганда в сайте Садлоу I в моделях БСА1-I и БСА2-I более близки между собой (рисунки 3.14Д и 3.14Е) по сравнению с БСА0-I (рисунок 3.14Г). Самое кардинальное отличие заключается в положении фосфорной группы параоксона относительно His241. В модели БСА0-I расстояние между фосфорильным кислородом лиганда и атомом Nε2 гистидина составляет 0.19 нм (рисунок 3.14Г), а в моделях БСА1-I и БСА2-I 0.65 нм и 0.52 нм соответственно (рисунки 3.14Д и 3.14Е). В моделях в моделях БСА1-I и БСА2-I гидроксильная группа Tyr149 образует водородную связь с атомом Nε2 His241 а в модели БСА0-I геометрия взаимного расположения этих аминокислот не соответствует критериям образования водородной связи. Конформация сайта Садлоу I в модели БСА2-I также несколько отличается от моделей БСА0-I и БСА1-I положением Lys221 относительно Arg217. Расстояния между атомами Cζ Arg218 и Nζ Lys221 равняются 0.53, 0.60, 0.96 нм в моделях БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I соответственно.

Устойчивая конформация параоксона в модели БСА0-I очень сильно отличается от конформации параоксона в неокисленном ЧСА (рисунки 3.14А и 3.14Г). Ориентация молекулы лиганда в случае первой степени окисления БСА в целом схожа с аналогичным комплексом параоксон-ЧСА, но фосфорная группа лиганда сориентирована по-разному (рисунки 3.14Б и 3.14Д). Возможно, такое различие между ЧСА и БСА связано с их асимметричностью: Lys195 и Lys199 в ЧСА заменены на Arg194 и Arg198 в БСА, тогда как Arg222 в ЧСА заменен на Lys221 в БСА.

Мы проанализировали конформацию Cys34 и его окружения (рисунок 3.15). В модели ЧСА0-I Cys34 взаимодействует с имидазольным кольцом His39, а в моделях ЧСА1-I и ЧСА2-I – нет (рисунки 3.15А, 3.15Б, 3.15В). В модели ЧСА0-I ориентация имидазольного кольца His39 относительно Tyr140 иная, чем в моделях ЧСА1-I и ЧСА2-I. Расстояния между атомом Nδ1 His39 и атомом гидроксильного кислорода Tyr140 составляют 0.29, 0.77 и 0.81 в моделях ЧСА0-I, ЧСА1-I и ЧСА2-I

I соответственно. Это кардинальное отличие модели ЧСА0-I от моделей ЧСА1-I и ЧСА2-I в «цистеиновом» сайте «перекликается» с отличием конформации Arg257 в модели ЧСА0-I от моделей ЧСА1-I и ЧСА2-I в сайте Садлоу I.



**Рисунок 3.15** – Конформация аминокислотного окружения Cys34 в зависимости от его степени окисления в комплексах ЧСА и БСА с параоксоном, связанным в сайте Садлоу I. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сулфиновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сулфиновой кислоты.

Кроме того, в случае восстановленного цистеина в ЧСА (рисунок 3.15А) ориентация бокового радикала Gln33 относительно Gln32 иная, чем в случае сульфеновой и сулфиновой кислот (рисунки 3.15Б, 3.15В). Расстояния между атомом Oε Gln32 и атомом Hε22 Gln33 составляют 0.37, 0.68 и 0.59 в моделях ЧСА0-I, ЧСА1-I и ЧСА2-I соответственно. Здесь также имеется корреляция с

различиями в положении Arg218 и Arg222 в сайте Садлоу I ЧСА (рисунки 3.14А, 3.14Б, 3.14В).

Как и в случае ЧСА, в модели БСА0-I Cys34 взаимодействует с имидазольным кольцом His39, а в моделях БСА1-I и БСА2-I – нет (рисунки 3.15Г, 3.15Д, 3.15Е). Как и в случае ЧСА, в модели БСА0-I ориентация имидазольного кольца His39 относительно Tyr139 иная, чем в моделях БСА1-I и БСА2-I. Расстояния между атомом Nδ1 His39 и атомом гидроксильного кислорода Tyr139 составляют 0.35, 0.68 и 0.77 в моделях БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I соответственно. И снова, как и в случае ЧСА, это отличие модели БСА0-I от моделей БСА1-I и БСА2-I в «цистеиновом» сайте коррелирует с отличием положения параоксона в сайте Садлоу I в моделях БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I (рисунки 3.14Г, 3.14Д, 3.14Е).

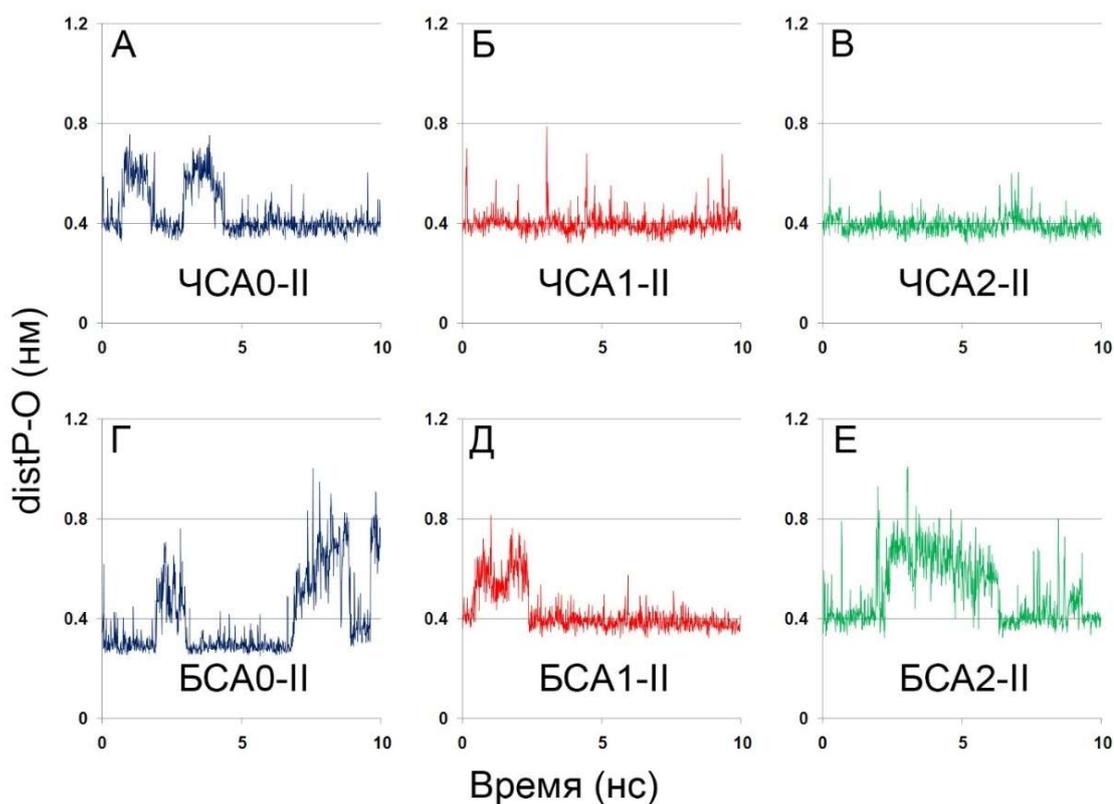
Что касается аминокислотных остатков Gln32 и Gln33 в БСА, расстояния между атомом Oε Gln32 и атомом Nε22 Gln33 составляют 0.61, 1.10 и 0.53 в моделях БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I соответственно (рисунки 3.15Г, 3.15Д, 3.15Е). То есть, в случае БСА нет корреляции между взаимным расположением Gln32 и Gln33 и конформацией параоксона в сайте Садлоу I.

Таким образом, согласно полученным нами данным, редокс-статус Cys34 оказывает влияние на положение молекулы параоксона в сайте Садлоу I, и, по всей видимости, этот эффект передаётся через систему аминокислот Cys34, His39 и Tyr140(Tyr139). Окисление Cys34 меняет конформацию боковых радикалов этих аминокислот, что в свою очередь влияет на взаимное расположение аминокислот сайта Садлоу I. Самому большому влиянию подвержены Arg257, His242, Arg218 и Arg222 в ЧСА и Arg256, His241, Arg217 и Lys221 в БСА. Интересно отметить, что в молекуле КСА Tyr140(Tyr139) заменён на остаток гистидина His140. Как эта система работает в альбумине крысы, ещё предстоит выяснить.

### *3.4.3. Сайт Садлоу II*

По аналогии с сайтом Садлоу I, конформационные изменения моделей ЧСА1-II, ЧСА2-II, БСА1-II и БСА2-II (первая и вторая степени окисления ЧСА и БСА, параоксон в сайте Садлоу II) были изучены методом молекулярной динамики.

Аналогичные расчеты для моделей ЧСА0-II и БСА0-II (восстановленный Cys34) уже были проведены ранее [63]. Были рассчитаны зависимости значений RMSD для атомов C $\alpha$  молекулы альбумина от их начального положения. Значение RMSD для всех комплексов увеличивалось в течение первых 2-6 нс симуляции, затем выходило на плато и варьировало в диапазоне 0.3 – 0.5 нм, что указывает на стабилизацию конформации молекулы альбумина.



**Рисунок 3.16** – Зависимости от времени значений расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr411 (Tyr410) (distP-O) сайта Садлоу II ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты.

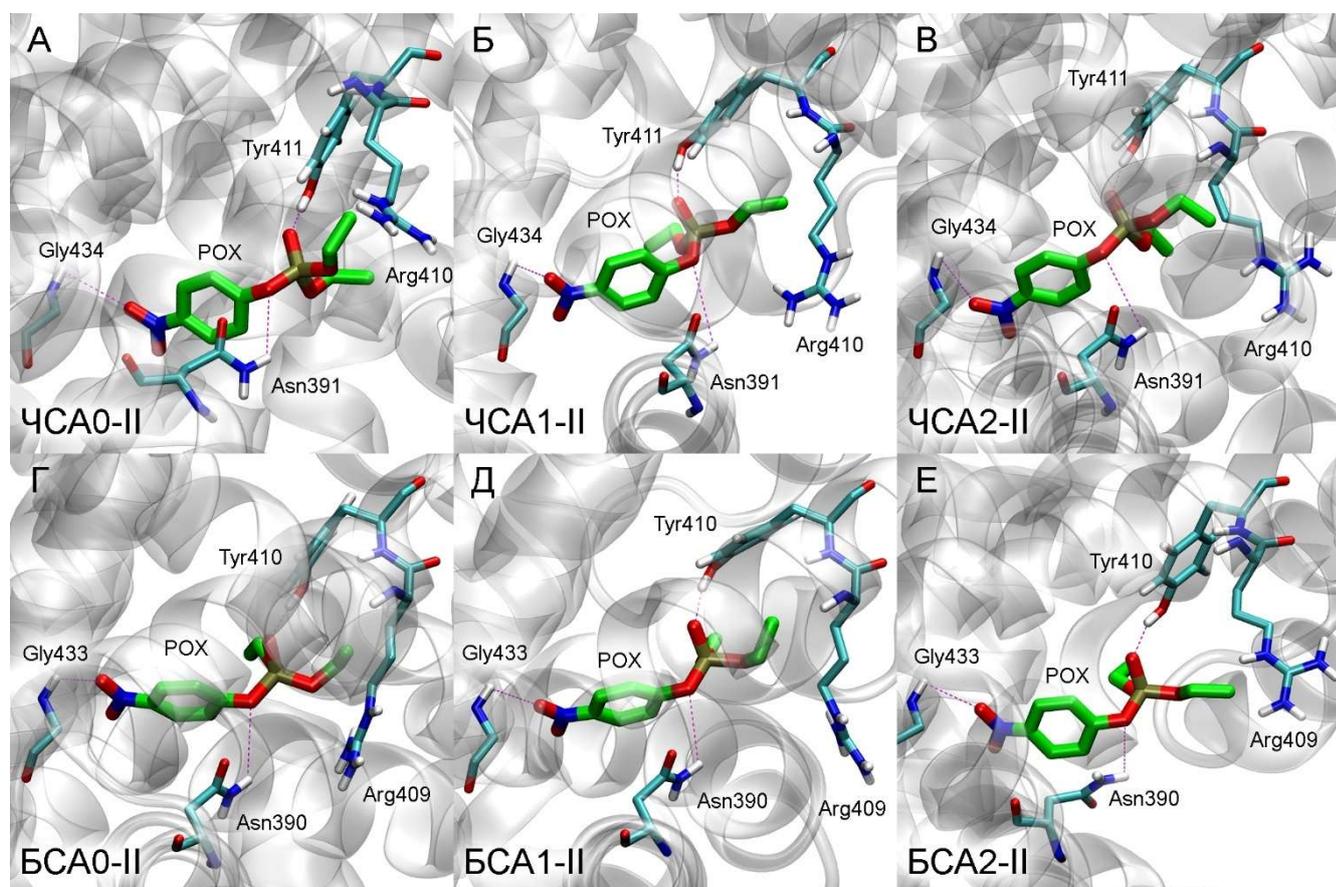
В модели ЧСА0-II участки стабильности, на которых значение distP-O колеблется около 0.4 нм, чередуются с участками нестабильности, на которых

молекула параоксона отдалается от тирозина Tyr411 (рисунок 3.16А). На всех стабильных участках положение параоксона одинаково: молекула лиганда стабилизируется образованием водородной связи между группой ОН тирозина и фосфорильным атомом кислорода параоксона. Анализ зависимости расстояния между гидроксильным атомом водорода Tyr11 и фосфорильным атомом кислорода лиганда показал, что периоды стабильного положения параоксона в сайте связывания совпадают с периодами существования водородной связи между этими атомами. А увеличению расстояния между параоксоном и тирозином, то есть уходу параоксона из сайта связывания, предшествует разрыв этой водородной связи.

В модели ЧСА1-II зависимость значения  $\text{distP-O}$  от времени выглядит схожим с моделью ЧСА0-II образом: участки стабильности, на которых значение  $\text{distP-O}$  колеблется около 0.4 нм и существует водородная связь между группой ОН тирозина и фосфорильным атомом кислорода параоксона, чередуются с участками нестабильности, на которых молекула параоксона отдалается от тирозина Tyr411, а водородная связь разрывается (рисунок 3.16Б). Единственное отличие состоит в том, что в модели ЧСА1-II промежутки нестабильности существенно короче. По всей видимости, окисление Cys34 до сульфеновой кислоты стабилизирует положение параоксона в продуктивной конформации в сайте Садлоу II ЧСА. В модели ЧСА2-II значение  $\text{distP-O}$  остается неизменным на протяжении всего периода симуляции и колеблется на уровне 0.4 нм (рисунок 3.16В), то есть в случае сульфеновой кислоты в ЧСА положение параоксона еще более стабильно.

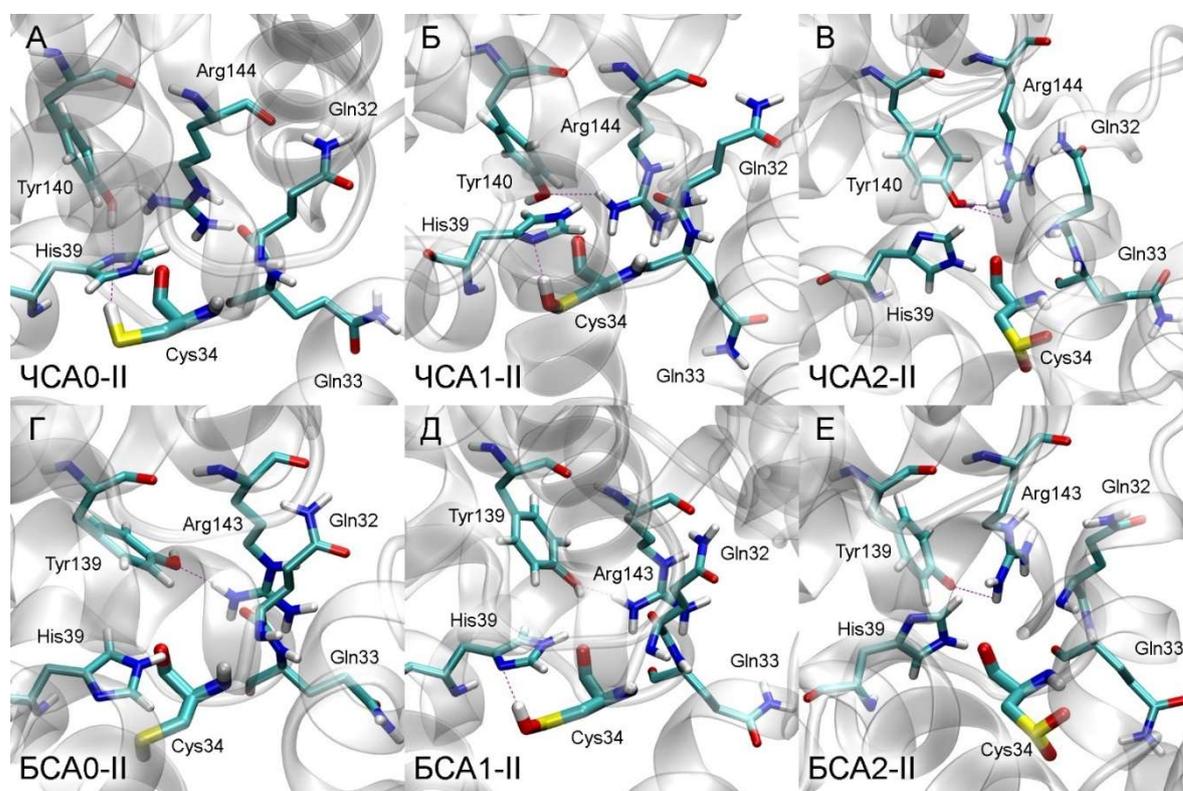
В случае БСА зависимость  $\text{distP-O}$  от времени выглядит аналогичным образом: участки стабильности, на которых значение  $\text{distP-O}$  колеблется около 0.4 нм и существует водородная связь между группой ОН тирозина и фосфорильным атомом кислорода параоксона, чередуются с участками нестабильности, на которых молекула параоксона отдалается от тирозина Tyr410, а водородная связь разрывается (рисунки 3.16Г, 3.16Д, 3.16Е). Однако, в отличие от ЧСА, окисление Cys34 не сильно влияет на стабильность параоксона в продуктивной конформации.

Конформации продуктивных комплексов в моделях ЧСА0-II, ЧСА1-II, ЧСА2-II, БСА0-II, БСА1-II и БСА2-II представлены на рисунке 3.17. Как видно из рисунка, конформации сайта Садлоу II близки между собой для разных степеней окисления цистеина в ЧСА и БСА. Наложение моделей друг на друга выявило, что конформации этих комплексов немного отличаются друг от друга положением бокового радикала Arg410(Arg409). Однако это различие не влияет на ориентацию параоксона относительно аминокислотного окружения.



**Рисунок 3.17** – Устойчивые продуктивные конформации параоксона (PAR) в сайте Садлоу II ЧСА и БСА с разной степенью окисления Cys34. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты.

По аналогии с сайтом Садлоу I, мы проанализировали конформацию Cys34 и его окружения (рисунок 3.18). В моделях ЧСА0-II и ЧСА1-II Cys34 взаимодействует с имидазольным кольцом His39, в модели ЧСА2-II – нет, что влияет на положение гидроксильной группы Tyr140. Расстояния между атомом Oε Gln32 и атомом Hε22 Gln33 составляют 0.67, 1.10 и 1.01 в моделях ЧСА0-II, ЧСА1-II и ЧСА2-II, соответственно. В случае БСА интересно отметить, что в модели БСА0-II тиоловая группа цистеина Cys34, в отличие от модели БСА0-I (параоксон в сайте Садлоу I) взаимодействует не с имидазольным кольцом His39, а с карбоксильным атомом кислорода бокового радикала Glu38. В модели БСА1-II Cys34 взаимодействует с атомом Nδ1 гистидина, а модели БСА2-II – нет.



**Рисунок 3.18** – Конформация аминокислотного окружения Cys34 в зависимости от его степени окисления в комплексах ЧСА и БСА с параоксоном, связанным в сайте Садлоу II. А – ЧСА с восстановленным Cys34; Б – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; В – ЧСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты; Г – БСА с восстановленным Cys34; Д – БСА с Cys34, окисленным до сульфеновой кислоты; Е – БСА с Cys34, окисленным до сульфиновой кислоты.

Из этих наблюдений можно сделать два вывода. Первый состоит в том, что при различных конформациях Cys34 и его окружения конформация параоксона в сайте Садлоу II одинакова для всех моделей. То есть редокс-статус альбумина слабо влияет на взаимодействие лигандов с сайтом Садлоу II. В целом, это согласуется с нашими предыдущими результатами биохимических и расчетных экспериментов, которые показали, что для альбуминов разных видов (быка, крысы и человека), имеющих различный суммарный заряд, взаимодействие параоксона в сайте Садлоу II отличается в меньшей степени, чем в сайте Садлоу I [27, 63-64].

Второй вывод заключается в том, что конформация «цистеинового» сайта зависит от того, связан ли параоксон в сайте Садлоу I или нет (рисунки 3.15 и 3.18). Этот результат представляет интерес с точки зрения того, что, по всей видимости, воздействуя на сайт Садлоу I некоторыми модуляторами, возможно влиять на антиоксидантные свойства альбумина, за которые преимущественно и отвечает тиоловая группа Cys34, а точнее – её доступность на поверхности белка и прочность связи SH.

#### *3.4.4. Оценка свободных энергий образования комплексов параоксона с альбумином*

По полученным траекториям методом MM-PBSA были рассчитаны свободные энергии образования комплексов альбумин-параоксон (таблицы 3.4 и 3.5). В сайте Садлоу I ЧСА значения свободных энергий образования комплексов альбумина с параоксоном практически идентичны (таблица 3.4). Тем не менее, вклад составляющих этой энергии отличается в моделях ЧСА0-I, ЧСА1-I и ЧСА2-I. Чем выше степень окисления Cys34, тем меньше вклад потенциальной энергии взаимодействия ( $E_{MM}$ ). Разницу в значение  $E_{MM}$  вносит преимущественно энергия электростатических взаимодействий белка с лигандом: чем выше степень окисления цистеина, тем слабее электростатические взаимодействия параоксона с альбумином. В случае модели ЧСА2-I значение  $E_{el}$  положительно. Поскольку в приближении классической механики заряды на атомах параоксона и аминокислот сайта неизменны с течением времени, ослабление электростатических

взаимодействий связано с увеличением расстояния между заряженными атомами из-за конформационных различий в структуре сайта при разных степенях окисления цистеина. Анализ вклада различных аминокислот в энергию взаимодействия показал, что разница в значениях  $E_{MM}$  связана с Arg257. В модели ЧСА0-I его вклад составляет -3.8 ккал/моль, в модели ЧСА1-I – 0 ккал/моль и в модели ЧСА2-I – -0.5 ккал/моль. Между моделями ЧСА1-I и ЧСА2-I основные различия состоят во вкладе Ile290 (-1.8 и -1.0 ккал/моль в модели ЧСА1-I и ЧСА2-I соответственно), Arg218 (-1.7 и -0.8 ккал/моль) и Arg222 (-1.3 и -0.6 ккал/моль).

Однако «недостаток» электростатических взаимодействий лиганда с белком компенсируется слагаемым  $\Delta G_{polar}$  – вкладом полярных взаимодействий в свободную энергию сольватации: чем слабее взаимодействие между лигандом и белком, тем меньше ощутима разница во взаимодействии белка и лиганда с водным окружением до и после образования комплекса (таблица 3.4).

Сродство сайта Садлоу I БСА к параоксону возрастает с увеличением степени окисления Cys34 (таблица 3.4). Значения потенциальной энергии взаимодействия ( $E_{MM}$ ) очень близки для трёх моделей. Основной вклад в значение  $E_{MM}$  вносят аминокислоты Tyr149, Arg217, His241, Arg256, Ile289, Glu291. С увеличением степени окисления Cys34 усиливается взаимодействие параоксона с остатками Arg217 (-0.2, -1.5 и -1.6 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I), Arg256 (0.2, -1.8 и -1.6 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I) и Ile289 (-0.5, -1.7 и -2.7 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I). Одновременно с этим ослабляется взаимодействие с остатками Tyr149 (-1.9, -0.2 и -0.1 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I), His241 (-2.1, -1.0 и -0.5 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I) и Glu291 (-3.5, -2.0 и -1.1 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I). Но, как и в случае ЧСА, слагаемое  $\Delta G_{polar}$  (вклад полярных взаимодействий в свободную энергию сольватации) уменьшается с увеличением степени окисления Cys34 БСА (таблица 3.4).

**Таблица 3.4** – Энергетические характеристики ЧСА и БСА с параоксоном в сайте Садлоу I

ЧСА	Энергия, ккал/моль	Модель ЧСА0-I (Cys34-SH)	Модель ЧСА1-I (Cys34-SOH)	Модель ЧСА2-I (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )
	$E_{vdw}$	-34.7±2.0	-35.8±2.0	-33.2±1.7
	$E_{el}$	-5.7±3.9	-0.7±2.1	2.5±1.6
	$E_{MM}$	-40.5±4.6	-36.5±3.7	-30.7±1.8
	$\Delta G_{polar}$	23.2±3.4	19.5±3.9	14.0±2.4
	$\Delta G_{non-polar}$	-3.5±0.2	-3.5±0.2	-3.6±0.1
	$\Delta G$	-20.8±2.5	-20.6±2.0	-20.3±2.0
БСА	Энергия, ккал/моль	Модель БСА0-I (Cys34-SH)	Модель БСА1-I (Cys34-SOH)	Модель БСА2-I (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )
	$E_{vdw}$	-35.0±1.9	-34.3±1.8	-35.6±2.2
	$E_{el}$	-7.0±3.4	-5.9±2.6	-5.4±1.8
	$E_{MM}$	-42.0±3.8	-40.2±3.2	-41.0±2.5
	$\Delta G_{polar}$	34.3±6.0	27.7±7.2	22.1±3.7
	$\Delta G_{non-polar}$	-3.5±0.2	-3.5±0.2	-3.5±0.2
	$\Delta G$	-11.2±3.4	-16.0±6.9	-22.4±3.4 *

\* –  $p < 0.05$ .  $E_{MM}$  – потенциальная энергия взаимодействия лиганда с белком, рассчитанная методом молекулярной механики в вакууме.  $E_{MM}=E_{vdw}+E_{el}$ , где  $E_{vdw}$  – энергия ван-дер-ваальсовых сил,  $E_{el}$  – энергия электростатических взаимодействий белка и лиганда.  $G_{polar}$  и  $G_{non-polar}$  – вклад полярных и неполярных взаимодействий в энергию сольватации,  $\Delta G$  – итоговое значение свободной энергии образования комплекса.

В связи с выявленными нами межвидовыми различиями во влиянии окисления Cys34 на связывающие свойства сайта Садлоу I следует отметить работу [131]. В этом обзоре авторы анализируют результаты своих многолетних экспериментов, направленных на изучение влияния гликирования альбумина на его

антиоксидантные свойства, за которые преимущественно отвечает тиоловая группа Cys34. Согласно данным этих исследований, гликирование ЧСА в условиях *in vitro* существенно уменьшает его антиоксидантную активность, тогда как гликирование БСА усиливает его антиоксидантные свойства. Мы полагаем, что различия в конформационном поведении альбуминов человека и быка (и, как следствие, в различной реакции на воздействие модуляторов) могут быть связаны с меньшими стерическими размерами сайта Садлоу I БСА по сравнению с ЧСА (замена Lys195 и Lys199 в ЧСА на более разветвленные Arg194 и Arg198 в БСА). Ещё одним объяснением может быть тот факт, что ЧСА обладает более высокой пластичностью в растворе по сравнению с БСА [128].

Для сайта Садлоу II ЧСА и БСА значения свободной энергии образования комплексов альбумин-параоксон слабо зависят от степени окисления Cys34 (таблица 3.5). Более того, и межвидовые различия особо не влияют на значения  $\Delta G$ . В случае модели ЧСА1-I связывание чуть более сильное, чем в моделях ЧСА0-I и ЧСА2-I, что согласуется с отличиями в геометрии сайта Садлоу II в модели 2, описанными выше, но различия статистически не значимы. Для БСА интересно отметить, что в модели БСА1-I значение  $E_{MM}$  ниже, а  $\Delta G_{polar}$  выше, чем в моделях БСА0-I и БСА2-I. Основной вклад в разницу  $E_{MM}$  вносят остатки Asn390 (-1.8, -2.3 и -1.8 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I), Tyr410 (1.7, -2.2 и -1.7 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I) и в меньшей степени Leu386 (-0.8, -1.2 и -0.7 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I). В это же самое время Asn390 и Tyr410 вносят максимальный вклад в различия слагаемого  $\Delta G_{polar}$ . Значения для Asn390 составляют 2.7, 3.2 и 2.7 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I, а для Tyr410 – 1.7, 2.1 и 1.5 ккал/моль для моделей БСА0-I, БСА1-I и БСА2-I.

**Таблица 3.5** – Энергетические характеристики комплексов ЧСА и БСА с параоксоном в сайте Садлоу II

	Энергия, ккал/моль	Модель ЧСА0-II (Cys34-SH)	Модель ЧСА1-II (Cys34-SOH)	Модель ЧСА2-II (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )
	ЧСА	$E_{vdw}$	-33.6±2.6	-34.1±2.2
$E_{el}$		-4.7±1.6	-3.9±1.6	-4.7±1.5
$E_{MM}$		-38.3±2.5	-37.9±2.8	-38.3±2.7
$\Delta G_{polar}$		16.6±2.7	15.3±2.8	17.0±3.3
$\Delta G_{non-polar}$		-3.6±0.2	-3.5±0.2	-3.6±0.2
$\Delta G$		-25.2±2.8	-26.1±2.2	-24.8±2.4
	Энергия, ккал/моль	Модель БСА0-II (Cys34-SH)	Модель БСА1-II (Cys34-SOH)	Модель БСА2-II (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )
	БСА	$E_{vdw}$	-32.8±2.1	-36.0±2.4
$E_{el}$		-3.8±1.7	-5.3±1.6	-3.3±2.4
$E_{MM}$		-36.6±2.4	-41.3±2.9	-36.3±3.3
$\Delta G_{polar}$		16.2±3.9	19.5±3.5	14.5±3.9
$\Delta G_{non-polar}$		-3.5±0.2	-3.6±0.2	-3.5±3.2
$\Delta G$		-23.9±3.0	-25.4±3.1	-25.3±2.2

$E_{MM}$  – потенциальная энергия взаимодействия лиганда с белком, рассчитанная методом молекулярной механики в вакууме.  $E_{MM}=E_{vdw}+E_{el}$ , где  $E_{vdw}$  – энергия ван-дер-ваальсовых сил,  $E_{el}$  – энергия электростатических взаимодействий белка и лиганда.  $G_{polar}$  и  $G_{non-polar}$  – вклад полярных и неполярных взаимодействий в энергию сольватации,  $\Delta G$  – итоговое значение свободной энергии образования комплекса.

Чтобы понять, как окисление редокс-сайта БСА до сульфеновой кислоты влияет на связывание параоксона с сайтом Садлоу I, мы проанализировали сеть взаимодействий между сайтами. Для анализа использовали конформации белок-лиганд после 10 нс симуляции МД. Как и в случае цистеинилирования (см. раздел 3.3.2), окисленный Cys34 теряет водородную связь с His39. «Вакантное место» занимает Ser28, гидроксильная группа которого в окисленном альбумине образует

водородную связь с имидазольным кольцом His39, при этом также разрушается водородная связь между Tyr139 и His39. Сближение Ser28 и His39 приводит к тому, что аминокислота Phe148 смещается по направлению к паре Ser28-Gln29, «утягивая» за собой за собой аминокислоты сайта Садлоу I: Tyr149, His241 и Arg198. В результате конфигурация сайта Садлоу I меняется, и молекула параоксона отдалается от пары Tyr149-His241.

Таким образом, анализ связывающей активности сайтов Садлоу в очередной раз подтвердил консервативность сайта Садлоу II по сравнению с сайтом Садлоу I, отмеченную в многочисленных исследованиях [4, 11, 16, 27, 64, 87]. Полученные нами данные указывают и на видовые различия во влиянии окисления Cys34 на функциональные свойства альбумина.

### **3.5. Влияние редокс-статуса сывороточного альбумина на его функциональные характеристики в условиях *in vivo*, *in vitro* и *in silico*: сравнительный анализ**

Сопоставление наших результатов, описанных в разделах 3.2, 3.3 и 3.4 позволяет заключить, что в эксперименте *in vitro* окисление тиоловой группы Cys34 БСА усиливает связывание НФА в сайте Садлоу I, но уменьшает значение  $V_{max}$ . В эксперименте *in silico* окисление тиоловой группы влияет на конформацию параоксона в сайте Садлоу I БСА и усиливает связывание лиганда в сайте. Мы полагаем, что стабильность продуктивных комплексов отражает соотношение констант скорости  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_{-1}$  и  $k_{-2}$ , согласно схеме 1 определяющих значение  $K_M^{app}$ : чем стабильнее продуктивная конформация и меньше значение distC-O, тем выше сродство (аффинность) и прочность фермент-субстратного комплекса, т.е.  $(k_1 + k_2) \gg (k_{-1} + k_{-2}) \approx k_3$ . В этом ключе наши данные *in silico* согласуются с данными *in vitro* для сайта Садлоу I БСА и для НФА или параоксона в качестве субстратов.

В эксперименте *in vitro* окисление тиоловой группы Cys34 БСА ослабляет связывание НФА в сайте Садлоу II, но не влияет на скорость реакции. В эксперименте *in silico* окисление тиоловой группы не влияет на конформацию

параоксона в сайте Садлоу II БСА и не оказывает существенного влияния на сродство сайта к субстратам; вероятно, в данном случае  $(k_1 + k_2) \approx (k_{-1} + k_{-2}) \gg k_3$ .

При исследовании ЧСА в нашем эксперименте *in silico* окисление Cys34 влияло на конформацию параоксона в сайте Садлоу I, но не влияло на сродство сайта к лиганду. Отсутствие данных *in vitro* сильно затрудняет интерпретацию, тем не менее можно предположить следующий баланс констант скорости в результате окисления Cys34:  $(k_1 + k_2) > (k_{-1} + k_{-2}) > k_3$ . Так же как и для БСА, окисление тиоловой группы не влияло на конформацию параоксона в сайте Садлоу II и не влияло на сродство сайта к лиганду.

Сопоставим теперь наши данные с похожими экспериментами из литературы. Авторы работы [30] окисляли Cys34 альбумина человека этакриновой кислотой и методами масс-спектропии и кругового дихроизма измеряли связывающую способность ЧСА до и после модификации. Было показано, что окисление цистеина не влияло на эффективность связывания фенилбутазона в сайте Садлоу I и диазепам в сайте Садлоу II, однако улучшало эффективность связывания билирубина в третьем мажорном сайте связывания альбумина (сайт III).

В работе [18] альбумин человека окисляли *in vitro* тремя различными способами: (1) с помощью катализируемой ионами металлов системы окисления (МСО), (2) хлорамином-Т и (3) пероксидом водорода. Затем измеряли связывающие свойства альбумина по отношению к варфарину (субстрату сайта Садлоу I) и кетопрофену (субстрату сайта Садлоу II) и скорость гидролиза по отношению к НФА. Оказалось, что окисление (любым способом) практически не влияло на связывание варфарина в сайте Садлоу I. Окисление пероксидом водорода не влияло на связывание кетопрофена в сайте Садлоу II, но окисление МСО и хлорамином-Т уменьшало сродство к кетопрофену. Окисление пероксидом водорода практически не влияло на скорость гидролиза НФА, тогда как окисление МСО и хлорамином-Т замедляло реакцию. В более поздней работе той же группы учёных [135] альбумин человека окисляли *in vitro* МСО и хлорамином-Т и

измеряли сродство белка к арипипразолу – лиганду сайта Садлоу II. Окисление и МСО, и хлорамином-Т снижало эффективность связывания арипипразола в сайте. Авторы объяснили разный эффект пероксида водорода, МСО и хлорамина-Т тем, что МСО и хлорамин-Т могут окислять не только Cys34, но и боковые радикалы лизинов и аргининов, в том числе остатков аргинина Arg410 и Arg485 [18, 135], локализованных в сайте Садлоу II.

Результаты экспериментов *in vivo* контрастируют с данными *in vitro* и *in silico*. Как уже отмечалось, при некоторых патологических состояниях и в процессе старения организма процентное содержание окисленной формы Cys34 может повышаться [118, 146]. В работе [114] было выявлено, что у пациентов с хронической болезнью почек и печени повышено содержание цистеинилированного по остатку Cys34 альбумина (ЧСА-Cys34-S-S-Cys). У этих пациентов в крови была повышена концентрация свободного варфарина (лиганда сайта Садлоу I) и диазепама (лиганда сайта Садлоу II) по сравнению со здоровыми пациентами. Авторы пришли к заключению, что модификация Cys34 ухудшает сродство сайтов Садлоу I и II к варфарину и диазепаму соответственно, что идёт в разрез с данными *in vitro* для варфарина и диазепама [18, 30]. В другом исследовании было показано, что альбумин пациентов с циррозом печени (заболевание, при котором также повышен процент содержания окисленной формы альбумина) слабее связывает лиганды сайта Садлоу II [85]. Существует несколько возможных объяснений этому несоответствию данных *in vitro* и *in vivo*. Одно из них заключается в том, что патология печени и почек может привести к повышенному содержанию определенных молекул в плазме крови, которые могут ингибировать (конкурентно или неконкурентно) связывание лигандов в сайтах Садлоу. Например, известно, что при циррозе печени в крови может быть повышен уровень глюкозы [117]. С другой стороны, авторы работы [100] показали в условиях *in vitro*, что окисление свободных SH-групп белка перманганатом калия приводит к увеличению числа сайтов на поверхности альбумина, доступных для связывания глюкозы. Имеются данные о том, что в молекуле альбумина

происходят конформационные изменения после связывания таких соединений как билирубин [81] и мочевины [154], концентрация которых тоже может меняться при патологических состояниях [82, 97]. Помимо этого, альбумин в плазме крови связан с жирными кислотами [157], которые также могут оказывать влияние на связывающие характеристики восстановленного и окисленного белка.

К сожалению, мы не нашли экспериментальных данных о влиянии окисления БСА на его связывающую активность в сайтах Садлоу. Мы полагаем, что в коммерческом альбумине аминокислоты, формирующие вход в сайт Садлоу II, также могут быть модифицированы, поэтому мы и выявили отличие во влиянии окисления Cys34 в условиях *in vitro* и *in silico*. Дальнейшие эксперименты с более широким набором различных окислителей и восстановителей помогут дополнить имеющиеся данные.

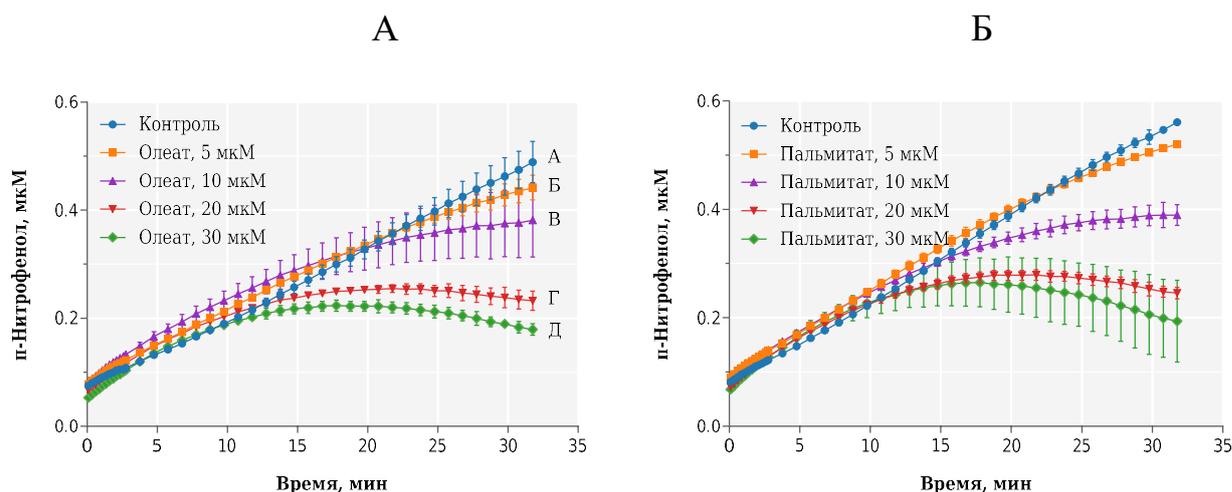
Что касается существенных отличий во влиянии окисления в условиях *in vivo* от условий *in vitro* и *in silico*, то, по всей видимости, основную роль в регуляции антиоксидантных свойств альбумина играют уже упомянутые ранее жирные кислоты. К такому выводу пришли Ю.А. Грызунов и его соавторы [7, 68]. Согласно полученным данным, интенсивность флуоресценции зонда К-35, взаимодействующего с сайтом Садлоу I, в ЧСА с полностью восстановленной SH-группой остатка Cys-34 была равна интенсивности флуоресценции зонда в альбумине, в котором тиоловая группа была полностью инактивирована N-этилмалеимидом. Был сделан вывод, что окисление SH-группы Cys34 не оказывает влияния на связывающий центр для К-35 в ЧСА [7]. Однако добавление в систему жирных кислот (олеиновая и линолевая) меняло картину. Связывание ЖК, во-первых, приводило к изменению конформации сайтов Садлоу I и II и повышению квантового выхода флуоресценции зондов дансиламида (лиганд сайта Садлоу I) и дансилсаркозина (лиганд сайта Садлоу II), а, во-вторых, вело к увеличению реакционной активности восстановленной тиоловой группы Cys34 по отношению к ДТНБ благодаря повышению его стерической доступности. Авторы выдвинули гипотезу, что ЖК при связывании с СА одновременно регулируют две его функции

– транспортную и антиоксидантную, то есть являются необходимым «посредником» влияния одной активности альбумина на другую [68].

На следующем этапе мы изучили влияние жирных кислот на связывающие и эстеразные свойства альбумина.

### 3.6. Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина

В представленной работе мы изучили влияние олеиновой кислоты (ОК) и пальмитиновой кислоты (ПК) на кинетику (псевдо)эстеразной активности БСА, ЧСА и КСА. На рисунке 3.19 показаны зависимости концентрации продукта гидролиза НФА альбумином *p*-нитрофенола от времени при разной концентрации ОК и ПК в растворе и при исходной концентрации НФА равной 60 мкМ.

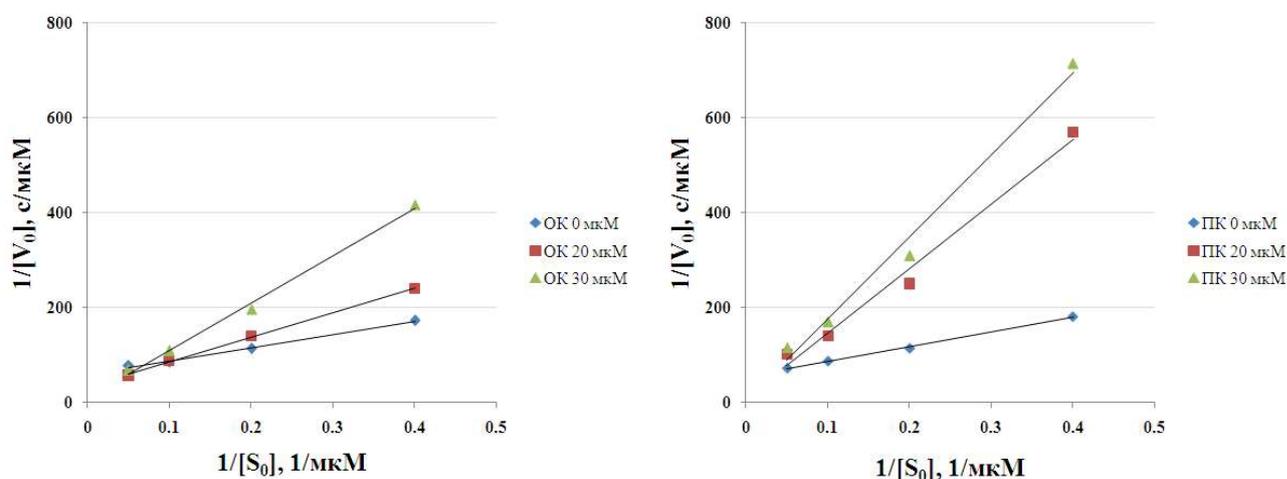


**Рисунок 3.19** – Расщепление НФА с высвобождением *p*-нитрофенола, катализируемое БСА в присутствии олеиновой (А) и пальмитиновой (Б) кислоты

ОК и ПК оказывают на БСА действие, схожее с выявленным ранее у ибупрофена и варфарина [64]. Скорость реакции экспоненциально замедляется, и наступает состояние равновесия. Согласно полученным данным, жирные кислоты обладают наиболее выраженным ингибирующим действием в отдаленный период процесса гидролиза НФА в присутствии БСА, то есть оказывают ингибирующий эффект на эстеразную активность альбумина в сайте Садлоу I (таблица 3.6).

Наиболее заметное ингибирование гидролиза наблюдается при наибольших концентрациях ЖК (20 и 30 мкМ).

На рисунке 3.20 представлена зависимость начальной скорости гидролиза НФА альбумином быка  $V_0$  от исходной концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка в отсутствие и в присутствии ОК и ПК в растворе. Константа скорости ингибирования эстеразной реакции  $k_{obs}$  олеиновой кислотой в концентрациях 20 и 30 мкМ равна, соответственно,  $2.37 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  и  $3.19 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Значения этой константы для пальмитиновой кислоты составили  $2.50 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  и  $3.64 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  для 20 и 30 мкМ, соответственно.



**Рисунок 3.20** – Скорость гидролиза НФА альбумином быка в отсутствие и в присутствии олеиновой (ОК, слева) и пальмитиновой кислоты (ПК, справа) в координатах Лайнуивера-Берка.

Противоположный результат был получен для альбуминов человека и крысы. ОК способна оказывать ингибирующее влияние на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II ЧСА и КСА. Анализ данных выявил неконкурентный тип ингибирования. Вычисленная равновесная константа ингибирования  $K_i$  сайта Садлоу II КСА оказалась в пять раз ниже, чем у ЧСА. При этом не было выявлено эффекта ингибирования эстеразной реакции в сайте Садлоу I (таблица 3.6).

Ранее, при изучении взаимодействия альбуминов разных видов с НФА и параоксоном было продемонстрировано, что функциональные характеристики ЧСА и КСА отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с функциональными характеристиками БСА [64]. Полученные в представленном исследовании данные в очередной раз подтверждают этот факт.

**Таблица 3.6** – Кинетические характеристики ингибирующего влияния олеиновой кислоты на гидролиз НФА в сайтах Садлоу I и II БСА, ЧСА и КСА

	<b>БСА</b>	<b>ЧСА</b>	<b>КСА</b>
<b>Садлоу I</b>	$K_i = 47.4 \pm 2.2$ мкМ	не ингибирует	не ингибирует
<b>Садлоу II</b>	не ингибирует	$K_i = 16.3 \pm 0.6$ мМ	$K_i = 3.4 \pm 0.5$ мМ

На следующем этапе методами молекулярного моделирования мы изучили взаимодействие параоксона с сайтами Садлоу I и II ЧСА в отсутствие и в присутствии молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 или FA2, которые согласно литературным данным, обладают максимальным сродством к ЖК (рисунок 1.1).

Был проведен молекулярный докинг параоксона в сайты Садлоу I и II ЧСА и молекулярный докинг ОК в сайты FA5 и FA2 ЧСА, в результате были получены шесть моделей для дальнейших расчетов:

- Олеиновая кислота отсутствует, параоксон в сайте Садлоу I
- Олеиновая кислота отсутствует, параоксон в сайте Садлоу II
- Олеиновая кислота в сайте FA5, параоксон в сайте Садлоу I
- Олеиновая кислота в сайте FA5, параоксон в сайте Садлоу II
- Олеиновая кислота в сайте FA2, параоксон в сайте Садлоу I
- Олеиновая кислота в сайте FA2, параоксон в сайте Садлоу II

На следующем этапе конформационные изменения полученных комплексов были рассчитаны методом молекулярной динамики. По полученным траекториям движений атомов для каждого комплекса была рассчитана зависимость от времени значения расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом

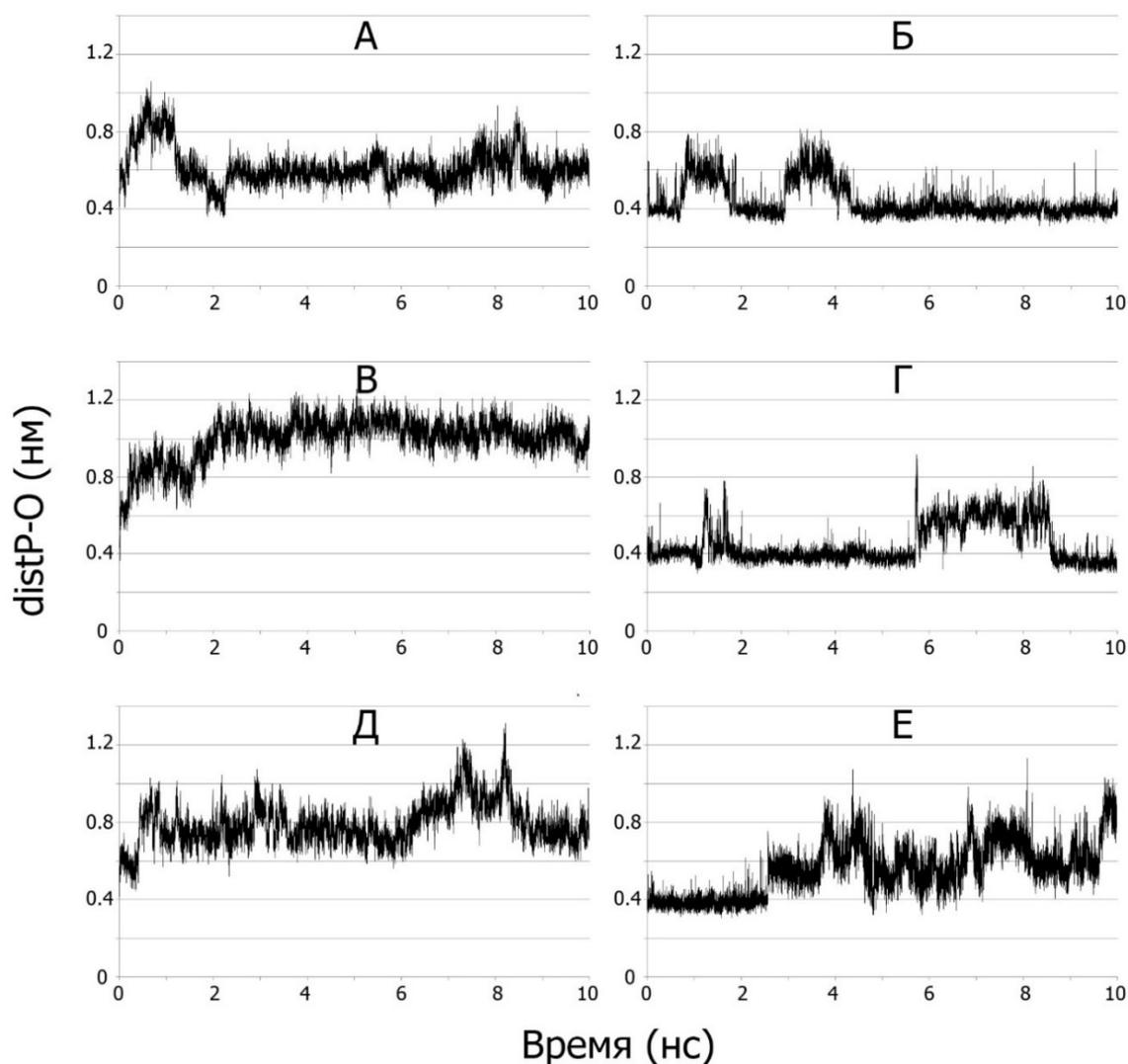
кислорода каталитического тирозина (Tyr150 для сайта Садлоу I и Tyr411 для сайта Садлоу II) (рисунок 3.21).

Согласно полученным данным, комплекс ЧСА с молекулой параоксона в сайте Садлоу I нестабилен (рисунок 3.21А). Значение  $\text{distP-O}$  первые 2 нс симуляции колеблется в промежутке 0.4-1.0 нм, затем оставшиеся 8 нс симуляции остается неизменным и колеблется незначительно на уровне 0.6 нм. В случае комплекса параоксона с сайтом Садлоу II, динамика этой зависимости выглядит следующим образом (рисунок 3.21Б): участки «стабильности», на которых расстояние колеблется в пределах 0.37-0.40 нм, чередуются с участками «нестабильности», на которых молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина. На участках «стабильности» расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина достаточно близкое для того, чтобы могла произойти нуклеофильная атака гидроксила тирозина на атом фосфора субстрата.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 влияет на геометрию связывания параоксона в сайте Садлоу I (рисунок 3.21В). Расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина быстро увеличивается в первые 2 нс симуляции, затем остается неизменным на протяжении почти всей симуляции и колеблется незначительно в районе значения 1 нм, то есть, в этом случае устойчивая конформация параоксона в сайте Садлоу I отличается от устойчивой конформации параоксона в свободном белке. Примечательно, что, даже находясь в другом домене альбумина (рисунок 3.21А), молекула олеиновой кислоты влияет на положение параоксона в сайте Садлоу I.

Ожидаемо, что связывание молекулы олеата в сайте FA2, который находится в непосредственной близости от сайта Садлоу I (рисунок 3.21В), повлиял на положение молекулы параоксона в сайте Садлоу I. Конформация параоксона в сайте также стабилизируется за 2 нс симуляции, затем расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического

тирозина остается практически неизменным и колеблется незначительно в районе величины 0.8 нм. И снова устойчивая конформация параоксона в сайте Садлоу I отличается от устойчивой конформации параоксона в свободном белке и в белке со связанной в сайте FA5 молекулой олеиновой кислоты.



**Рисунок 3.21** – Зависимость от времени значения расстояния (distP-O) между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина Ty150 для сайта Садлоу I (А, В, Д) и Ty411 для сайта Садлоу II (Б, Г, Е). А, Б – комплекс альбумина с параоксоном в отсутствие жирных кислот; В, Г – комплекс альбумина с параоксоном в присутствии молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5; Д, Е – комплекс альбумина с параоксоном в присутствии молекулы олеиновой кислоты в сайте FA2.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 немного влияет на связывание параоксона в сайте Садлоу II (рисунок 3.21Г). Участки «стабильности», на которых расстояние  $\text{distP-O}$  колеблется в пределах 0.37-0.40 нм, чередуются с участками «нестабильности», на которых молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина. Только в случае присутствия олеата в сайте FA5 участки «нестабильности» удлиняются. В целом, связывание олеиновой кислоты в сайте FA5 немного уменьшает вероятность образования новой ковалентной связи, то есть несколько снижает псевдоэстеразную активность альбумина по отношению к параоксону.

Связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA2 существенно влияет на геометрию связывания параоксона в сайте Садлоу II (рисунок 3.21Е). Значение  $\text{distP-O}$  остается стабильным только первые 2 нс симуляции, затем молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина и не возвращается в продуктивную конформацию на протяжении оставшихся 8 нс. Таким образом, связывание молекулы олеиновой кислоты уменьшает вероятность образования новой ковалентной связи, то есть снижает псевдоэстеразную активность альбумина по отношению к параоксону.

На следующем этапе на основе полученных методом молекулярной динамики траекторий движения атомов были рассчитаны значения свободных энергий ( $\Delta G$ ) образования исследуемых комплексов альбумина с параоксоном (таблица 3.7). Как видно из таблицы 3.7 и рисунка 3.21, связывание молекулы олеиновой кислоты в сайте FA5 практически не влияет на эффективность связывания параоксона в сайт Садлоу I, а связывание в сайте FA2 – ухудшает. И наоборот, связывание олеиновой кислоты в сайте FA5 уменьшает эффективность взаимодействия с параоксоном в сайте Садлоу II, а связывание в сайте FA2 – не влияет. Такой эффект закономерен, поскольку сайт FA5 находится в непосредственной близости от сайта Садлоу II, а сайт FA2 – от сайта Садлоу I.

**Таблица 3.7** — Оценочные значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов альбумина с параоксоном в отсутствие и присутствии олеиновой кислоты и продуктивность этих комплексов

параоксон	Олеиновая кислота		
	отсутствует	в сайте FA5	в сайте FA2
в сайте Садлоу I	-20.8±2.5 / (-)	-21.8±2.8 / (-)	-17.7±2.4 / (-)
в сайте Садлоу II	-25.2±2.8 / (+)	-23.0±2.9 / (+)	-24.9±2.6 / (-)

(+) - комплекс продуктивен, (-) - комплекс не продуктивен.

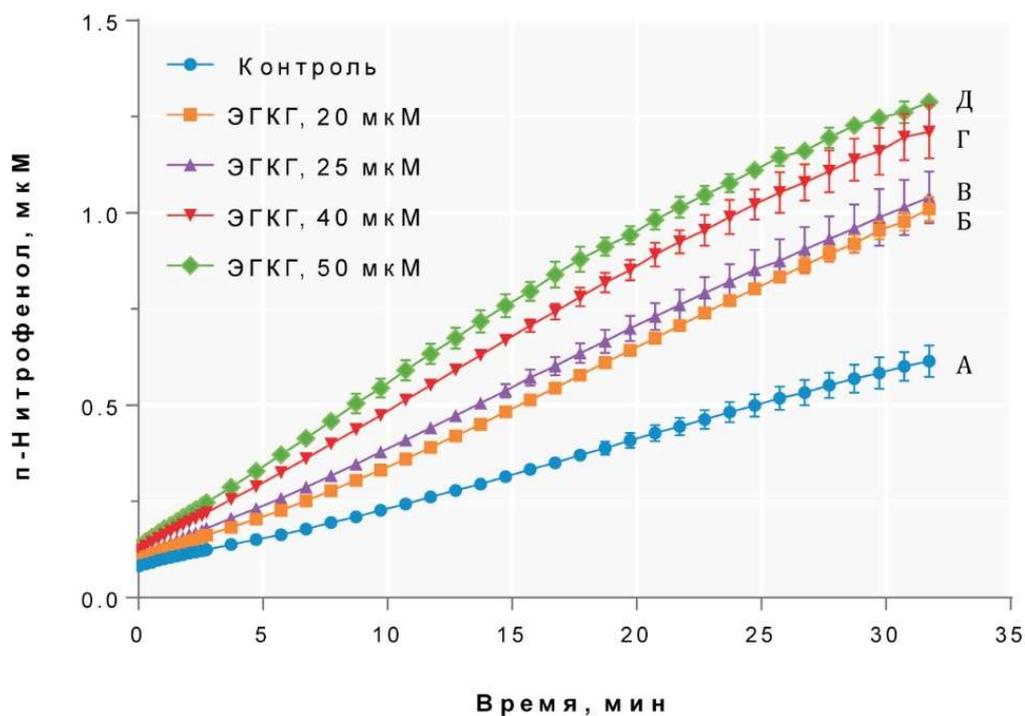
Олеиновая кислота в реальных условиях будет связываться и в сайте FA5, и в сайте FA2. Поэтому можно ожидать, что повышенная концентрация жирных кислот в крови, даже без учета конкуренции за связывание с сайтами Садлоу I (он же FA7) и Садлоу II (он же сайт FA3/4), будет оказывать (или не оказывать) следующее влияние на эстеразную и связывающую активность ЧСА:

- 1) не влиять на эстеразную реакцию в сайте Садлоу I
- 2) уменьшать вероятность псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II
- 3) уменьшать связывающую активность ЧСА по отношению к параоксону в сайте Садлоу I
- 4) уменьшать связывающую активность ЧСА по отношению к параоксону в сайте Садлоу II

Данные молекулярного моделирования в целом согласуются с результатами биохимических экспериментов по взаимодействию НФА с ЧСА в присутствии ЖК. Анализ вкладов различных энергетических составляющих выявил, что основные изменения в значениях свободных энергий связывания вносит энергия вандерваальсовых сил.

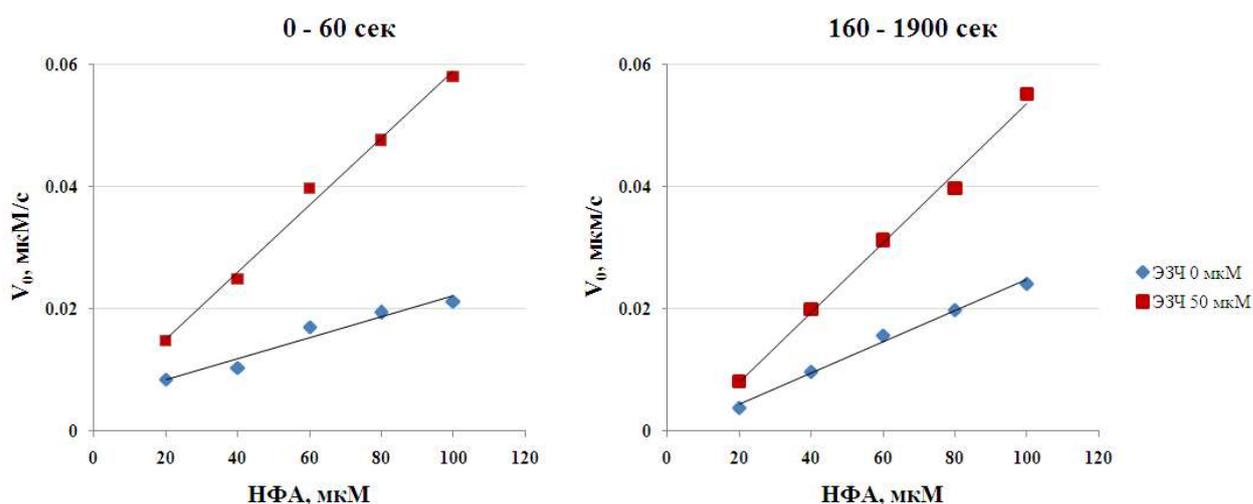
### 3.7. Влияние полифенолов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина

Зелёный чай является распространенным продуктом, а в популярной литературе активно распространяется информация о его благотворном влиянии на здоровье и общее состояние организма. В частности, его считают более предпочтительным для употребления, чем более сильно обработанный «чёрный» вариант. Ценность зелёного чая и его многогранная польза при регулярном употреблении объясняется именно наличием в его составе биологически активных веществ — полифенолов. Известно, что полифенолы зелёного чая могут связываться в обоих сайтах Садлоу. При этом они составляют конкуренцию многим другим соединениям, так же способным связываться в этих сайтах [51]. Анализ данных, полученных при инкубировании БСА с НФА в присутствии ЭГКГ (мажорного полифенола ЭЗЧ), выявил активирующее влияние ЭГКГ на скорость гидролиза НФА альбумином (рисунок 3.22).



**Рисунок 3.22** – Гидролиз НФА с высвобождением п-нитрофенола, катализируемое БСА в присутствии ЭГКГ. Концентрация альбумина (Е) составляла 10 мкМ, а НФА (S) – 80 мкМ. А – контроль, без добавления ЭГКГ; Б, В, Г, Д – концентрация ЭГКГ 20, 25, 40, 50 мкМ, соответственно.

На рисунке 3.23 представлена зависимость начальной скорости гидролиза НФА альбумином  $V_0$  от исходной концентрации субстрата в отсутствие и в присутствии ЭГКГ в растворе. По полученным концентрационным зависимостям были вычислены кинетические параметры эстеразной реакции в сайте Садлоу I и псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II (таблицы 3.8 и 3.9).



**Рисунок 3.23** – Скорость гидролиза НФА бычьим альбумином в отсутствие и в присутствии ЭГКГ в начальный (слева) и отдаленный (справа) периоды.

**Таблица 3.8** – Кинетические параметры эстеразной реакции в сайте Садлоу I БСА к НФА в контроле и после добавления ЭГКГ

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу I		
	Стационарный режим		
	$K_M^{app}$ , мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M^{app} \times 10^{-6}$ , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
БСА + НФА	$20.7 \pm 1.5$	$0.0051 \pm 0.0004$	$246.4 \pm 19.3$
БСА + НФА + ЭГКГ 50 мкМ	$10.7 \pm 0.1^{**}$	$0.0072 \pm 0.0003^*$	$672.9 \pm 28.0$

\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

**Таблица 3.9** – Кинетические параметры псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II БСА по отношению к НФА в контроле и после добавления ЭГКГ

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу II			
	Предстационарный режим			
	$K_M^{app}$ , мкМ	$K_s$ , мкМ	$k_2$ , с <sup>-1</sup>	$k_2/K_M^{app}$ , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
БСА + НФА	3.44 ± 0.37	0.22 ± 0.07	0.44 ± 0.01	0.14 ± 0.02
БСА + НФА + ЭГКГ 50 мкМ	2.91 ± 0.01	1.21 ± 0.03 **	0.44 ± 0.01	0.15 ± 0.01

\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

Анализ полученных данных показал, что ЭГКГ снижает кажущуюся константу Михаэлиса  $K_M^{app}$  в 1.9 раза (при концентрации ЭГКГ 50 мкМ) по сравнению с контролем, повышая таким образом сродство альбумина к субстрату реакции, а также повышают каталитическую константу  $k_{cat}$  на 30% по сравнению с контролем. Каталитическая эффективность таким образом повышается в 2.7 раз по сравнению с контролем. Влияние ЭГКГ на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II выражается в увеличении константы диссоциации  $K_S$  по сравнению с контролем. Действие ЭГКГ на скорость гидролиза параоксона бычьим альбумином оказалось схожим с НФА (таблица 3.10).

Анализ полученных значений позволяет сказать, что ЭГКГ в 20 раз повышает сродство сайта Садлоу I альбумина к параоксону на фоне снижения каталитической константы  $k_3$  в 6 раз. Тем не менее, такое значительное повышение сродства альбумина к субстрату компенсирует снижение константы  $k_3$  (каталитическая эффективность увеличивается в 3.5 раз) и объясняет прирост в скорости реакции. Влияние, оказываемое ЭГКГ на активность сайта Садлоу II по отношению к параоксону, выражается в снижении субстратной константы  $K_s$  в 3 раза по сравнению с контролем. По всей видимости, это связано с увеличением константы прямой реакции  $k_1$  и/или снижением константы обратной реакции  $k_{-1}$ .

**Таблица 3.10** – Кинетические параметры параоксоназной и псевдоэстеразной реакции в сайтах альбумина Садлоу I и II в контроле и после добавления ЭГКГ

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу I			
	Стационарный режим			
	$K_m^{app}$	$k_3$	$k_3/K_m^{app}$	
	мкМ	$\times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$	$\times 10^{-6} \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$	
БСА + НФА	$197.0 \pm 20.6$	$0.89 \pm 0.05$	$4.5 \pm 0.3$	
БСА + НФА + ЭГКГ 50 мкМ	$9.6 \pm 1.8^{**}$	$0.15 \pm 0.01^{**}$	$15.6 \pm 1.0^{**}$	
	Сайт Садлоу II			
	Предстационарный режим			
	$K_m^{app}$	$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$	$k_2$	$\frac{k_2}{K_m^{app}}$
	мкМ		$\text{с}^{-1}$	$\text{мМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
БСА + НФА	$1.63 \pm 0.47$	$0.64 \pm 0.04$	$0.49 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.08$
БСА + НФА + ЭГКГ 50 мкМ	$1.30 \pm 0.05$	$0.18 \pm 0.11^*$	$0.45 \pm 0.01$	$0.35 \pm 0.02$

\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

Методами *in silico* на примере транс-резвератрола нами было изучено влияние полифенолов на связывание параоксона с ЧСА и КСА. Основной причиной, почему резвератрол был отобран в качестве модельного модулятора для расчетных экспериментов, является то, что в плазме крови он связывается с альбумином лучше других полифенолов [94], а благодаря небольшим размерам и простой структуре с лучшей точностью описывается математически по сравнению с ЭГКГ. Выбор ЧСА и КСА для нашего исследования обусловлен тем, что эксперименты *in vivo* проводятся преимущественно на грызунах [6]. Очевидно, что

экстраполяция на организм человека данных, полученных на крысах, не будет корректной без проведения сравнительного анализа влияния любых модуляторов активности (в частности резвератрола) на ЧСА и КСА. Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики мы количественно оценили влияние связывания резвератрола в сайте Садлоу I на геометрию и эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II ЧСА и КСА. Были рассчитаны временные зависимости величины расстояния между атомом кислорода каталитического тирозина (Tyr411) и атомом фосфора параоксона. Согласно полученным данным, добавление молекулы резвератрола к комплексу ЧСА-параоксон существенно не влияет на поведение молекулы параоксона в сайте Садлоу II. Как и в случае комплекса ЧСА-параоксон без резвератрола, молекула не достигает полностью стабильного положения внутри сайта связывания, и временные промежутки, на которых значение расстояния O-P колеблется в районе 0.40 нм (при этом условии возможно образование ковалентной связи между лигандом и белком), чередуется с временными промежутками, на которых молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина. В отличие от комплекса ЧСА-параоксон, комплекс КСА-параоксон оказывается более восприимчивым к добавлению резвератрола: поведение молекулы параоксона в сайте Садлоу II существенно меняется. Молекула параоксона отдаляется от остатка Tyr411 уже на предварительной стадии релаксации системы, и затем значение расстояния O-P не опускается ниже 0.48 нм, за исключением точечных осцилляций. При таком положении молекулы параоксона относительно каталитического Tyr411 невозможна реакция фосфорилирования тирозина. Т.е. присутствие молекулы резвератрола в сайте Садлоу I уменьшает вероятность реакции фосфорилирования в сайте Садлоу II КСА. Нами были рассчитаны энергии образования комплексов альбумин-параоксон в присутствии и в отсутствие резвератрола (таблица 3.11).

**Таблица 3.11** – Оценочные значения свободных энергии образования комплекса параоксона с сайтом Садлоу II ЧСА и КСА ( $\Delta G$ , ккал/моль) в отсутствие и в присутствии резвератрола

	в отсутствие резвератрола	в присутствии резвератрола
ЧСА	-25.2±2.8	-26.3±2.7
КСА	-28.2±1.8	-28.2±2.1

Сравнение полученных значений позволило сделать вывод, что резвератрол существенно не влияет на эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II. Таким образом, влияние резвератрола сводится лишь к уменьшению псевдэстеразной активности КСА по отношению к параоксону, которое не является статистически значимым. Альбумин крысы в целом больше подвержен аллостерической модуляции полифенолами (а возможно, и другими модуляторами), что может указывать на больший консерватизм альбумина человека по сравнению с альбумином крысы. В процессе эволюции крысы в большей степени вынуждены были адаптироваться к изменчивым условиям окружающей среды, так что КСА немного более лабилен по сравнению с ЧСА. Однако следует отметить, что различия в функциональных характеристиках ЧСА и КСА между собой не так существенны, как их общее отличие от сывороточного альбумина быка.

В целом, результат молекулярного моделирования согласуется с экспериментальными данными: сайт Садлоу II альбумина слабо подвержен аллостерической модуляции полифенолами, связывающимися в сайте Садлоу I. Поэтому воздействовать на альбумин (на сайт Садлоу I) можно лишь теми полифенолами, которые могут связываться и в сайте Садлоу II, в частности, ЭГКГ. Полученный результат частично объясняет некоторый защитный эффект экстракта ЭЗЧ при отравлении ФОС [5], однако надо понимать, что при однократном введении терапевтических доз полифенолов их уровень в плазме крови не будет

достигать минимально действующих концентраций в экспериментах *in vitro*. А при длительном введении ЭЗЧ его действие обусловлено не столько прямым взаимодействием с альбумином, сколько влиянием на экспрессию генов антиоксидантной защиты.

### **3.8. Определение влияния диазепама и карбоксима на скорость гидролиза НФА в присутствии БСА**

Диазепам и другие бензодиазепины применяют в комплексной терапии острого отравления ФОС в качестве противосудорожного средства. Карбоксим применяют для терапии отравления ФОС в качестве реактиватора холинэстераз. По этой причине возможность модуляции этими фармпрепаратами функциональных свойств альбумина по отношению к ФОС представляет большой интерес. На примере НФА в эксперименте *in vitro* мы изучили, как диазепам и карбоксим влияют на связывающую и ферментативную активность БСА, а затем методами молекулярного моделирования определили характер влияния диазепама на взаимодействие ЧСА и КСА с параоксоном. Согласно полученным данным, диазепам является ингибитором гидролиза НФА в обоих сайтах Садлоу, значения  $K_i$  составляют  $73.5 \pm 21.4$  и  $169.9 \pm 48.7$  мкМ для сайтов Садлоу II и Садлоу I, соответственно (таблица 3.12). Параметр  $\alpha$  для обеих стадий реакции много больше единицы, что свидетельствует о конкурентном типе ингибирования. Известно, что диазепам с высокой эффективностью связывается с сайтом Садлоу II. Таким образом, наши данные в очередной раз подтверждают, что диазепам может ингибировать псевдоэстеразную реакцию в сайте Садлоу II за счет конкуренции с молекулами субстрата за связывание с этим сайтом. Однако нами впервые получен результат, указывающий на то, что диазепам при изученных концентрациях может ингибировать также и эстеразную реакцию в сайте Садлоу I, причем не за счет аллостерической модуляции, а за счет прямой конкуренции за связывание с сайтом.

**Таблица 3.12** – Кинетические характеристики влияния диазепама на гидролиз НФА

	Предстационарный режим (Сайт Садлоу II)	Стационарный режим (Сайт Садлоу I)
$V_{\max}$ , мкМ/мин	3.0±0.6	2.7±0.4
$\alpha$ , мкМ <sup>-1</sup>	~ 4.128e+102	~ 9.752e+117
$K_i$ , мкМ	73.5±21.4	169.9±48.7
$K_M$ , мкМ	228.3±88.8	265.9±117.7
$R^2$	0.8393	0.9011

Следует отметить, что практического значения этот факт не имеет, т.к.  $K_i$  для сайта Садлоу I в тысячи раз превышает терапевтическую концентрацию диазепама в плазме крови. С другой стороны, диазепам может быть использован в экспериментах *in vitro* в качестве специфического ингибитора сайта Садлоу II, и его аллостерический эффект на взаимодействие сайта Садлоу I с лигандами следует иметь в виду.

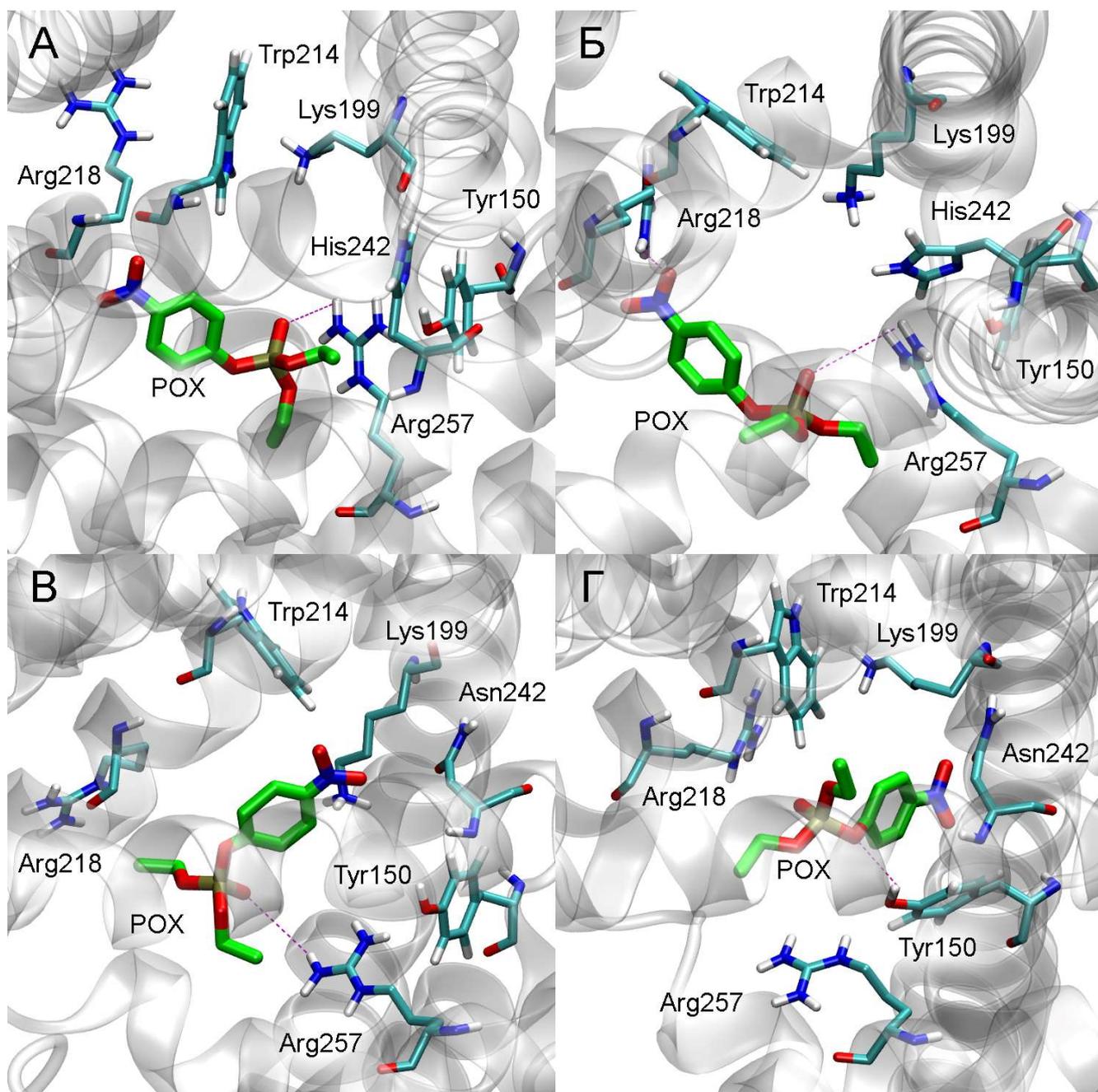
На следующем шаге методами молекулярного моделирования мы изучили влияние диазепама на взаимодействие альбумина с ФОС для определения механизма аллостерического влияния лигандов сайта Садлоу II на эффективность взаимодействия ФОС с сайтом Садлоу I.

Методом молекулярного докинга были получены одинарные и двойные комплексы ЧСА и КСА с параоксоном в сайте Садлоу I и диазепамом в сайте Садлоу II: ЧСА-параоксон, КСА-параоксон, ЧСА-диазепам, КСА-диазепам, ЧСА-параоксон-диазепам, КСА-параоксон-диазепам. На следующем этапе конформационные изменения комплексов были изучены методом молекулярной динамики. Прежде всего, нас интересовало положение молекулы параоксона относительно каталитического тирозина Tyr150, а именно расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr150 (distP-O).

Этот параметр важен для оценки продуктивности полученного белок-лигандного комплекса. Для образования новой ковалентной связи значение  $\text{distP-O}$  не должно превышать 0.4 нм. Конформация, в которой значение  $\text{distP-O}$  меньше 0.4 нм, называется продуктивной.

В отсутствие диазепама продуктивные комплексы альбумина с параоксоном в сайте Садлоу I нестабильны, параоксон за первые несколько пикосекунд удаляется от каталитического тирозина, и затем, на протяжении всего периода симуляции значение  $\text{distP-O}$  превышает необходимые для реакции 0.4 нм. Диазепам не повлиял на стабильность продуктивного комплекса альбумина человека с параоксоном: значение  $\text{distP-O}$  почти сразу возросло 0.8 нм и далее не уменьшалось, параоксон не приближался к каталитическому тирозину. Что касается альбумина крысы, согласно полученным данным, в присутствии диазепама после ряда конформационных изменений в точке 5 нс параоксон приблизился к каталитическому тирозину и оставался в этой позиции на протяжении оставшегося времени. На участке 6-8 нс значение  $\text{distP-O}$  незначительно колебалось в районе 0.4 ангстремов. Таким образом, согласно полученным данным, диазепам усиливает вероятность эстеразной реакции в сайте Садлоу I альбумина крысы, но не влияет на активность альбумина человека. Что касается молекулы диазепама в сайте Садлоу II ЧСА и КСА, ее положение стабильно на протяжении всего периода симуляции, не зависимо от того, есть ли параоксон в сайте Садлоу I.

Мы проанализировали положение параоксона в сайте Садлоу I альбуминов человека и крысы в отсутствие и в присутствии диазепама в сайте Садлоу II (рисунок 3.24). Для альбумина человека конформационный анализ положения молекулы параоксона в конечной точке траектории показал, что и в случае свободного сайта Садлоу II, и в присутствии диазепама в сайте Садлоу II молекула параоксона имеет схожую конформацию внутри сайта Садлоу I (рисунок 3.24А, Б).



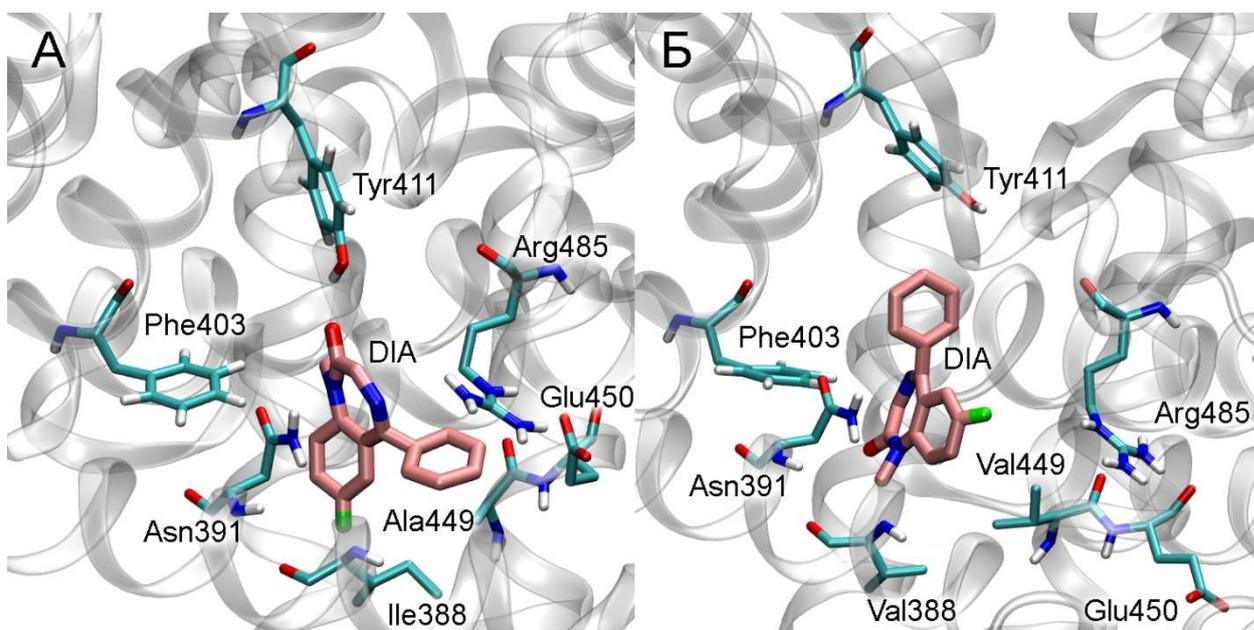
**Рисунок 3.24** – Конформация молекулы параоксона (POX) в сайте Садлоу I ЧСА (А, Б) и КСА (В, Г) в отсутствие (А, В) и в присутствии (Б, Г) молекулы диазепама (DIA) в сайте Садлоу II по данным молекулярной динамики

В этих комплексах молекула параоксона «вытянута» вдоль полости сайта: фосфорильный кислород образует водородную связь с одним из атомов водорода гуанидиновой группы Arg257, а нитрогруппа располагается вблизи выхода из сайта возле аминокислотного остатка Arg218, образуя водородную связь либо с

водородом его остова (в случае отсутствия диазепама в сайте Садлоу II), либо с боковым радикалом (в случае присутствия диазепама в Садлоу II). Конформация самого сайта Садлоу I также практически не зависит от присутствия диазепама. Положение параоксона в сайте Садлоу I КСА отличается от его положения лиганда в ЧСА. В случае КСА без диазепама фосфорильный кислород лиганда взаимодействует с гуанидиновой группой Arg257 (рисунок 3.24В). В присутствии диазепама фосфорильный кислород не образует каких-либо устойчивых взаимодействий, но гидроксильная группа Tyr150 образует водородную связь с одним из эфирных кислородов параоксона (рисунок 3.24Г). Сайт Садлоу I альбумина крысы имеет ряд существенных отличий от сайта Садлоу I альбумина человека. Так, аминокислотам His242, His288, Ile264, Leu219 в молекуле ЧСА соответствуют аминокислоты Asn242, Gln288, Met264, Met219 в молекуле КСА. Появление дополнительных электроотрицательных атомов (серы и кислорода) ожидаемо влияет на положение параоксона, имеющего в своей структуре отрицательно заряженные атомы кислорода и положительно заряженный фосфор. Более того, согласно полученным данным, появление диазепама влияет на конформацию сайта Садлоу I КСА и положение молекулы параоксона в этом сайте (рисунок 3.24Г).

Чтобы выявить конформационные изменения в сайте Садлоу II КСА, приводящие к конформационным изменениям в сайте Садлоу I, мы в первую очередь проанализировали конформацию диазепама в сайте Садлоу II ЧСА и КСА после 10 нс симуляции МД двойных комплексов ЧСА и КСА с диазепамом (в сайте Садлоу II) и параоксоном (в сайте Садлоу I). Результат представлен на рисунке 3.25.

В случае ЧСА конформация диазепама в сайте Садлоу II (рисунок 3.25А) совпадает с данными рентгеноструктурного анализа (код структуры 2bxf в базе данных PDB). Атом кислорода лиганда образует водородную связь с Tyr411, одно из ароматических колец связывается возле бокового радикала Asn391, другое – образует стэкинг-связь с боковым радикалом Arg485.

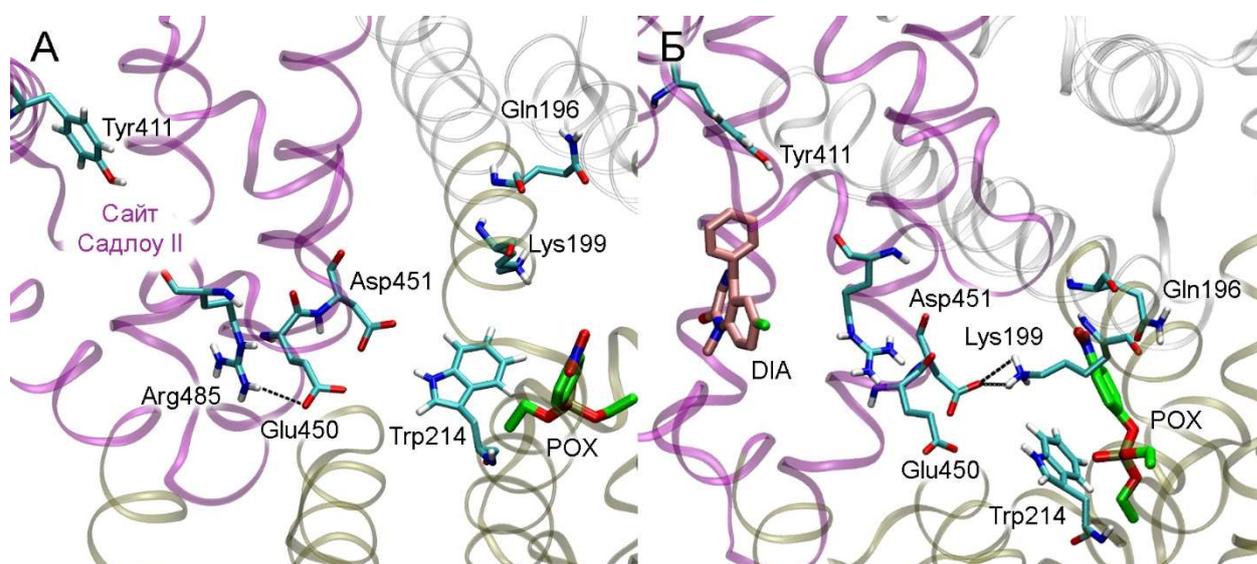


**Рисунок 3.25** – Взаимодействие диазепама (DIA) с сайтом Садлоу II ЧСА (А) и КСА (Б) по данным молекулярной динамики.

Ile388 и Ala449 в сайте Садлоу II ЧСА заменены на Val388 и Ala449 в сайте Садлоу II КСА. Из-за этих замен меняется форма сайта, большая и жесткая молекула диазепама принимает другое положение внутри сайта (рисунок 3.25Б). Атом хлора диазепама оказывается «направлен» в сторону Arg485, и гибкий боковой радикал аргинина меняет свою конформацию, «отодвигаясь» от массивного атом хлора. За счет изменения конформации Arg485, в молекуле КСА после связывания диазепама теряется водородная связь между Arg485 и Glu450. На следующем этапе мы рассмотрели, как эти конформационные изменения могут повлиять на сайт Садлоу I.

На рисунке 3.26 представлена конформация сайтов Садлоу КСА в присутствии и отсутствии диазепама в сайте Садлоу II. Если сайт Садлоу II свободен от диазепама (рисунок 3.26А), Arg485 и Glu450 образуют водородную связь, а между аминокислотными остатками доменов DII (показан коричневым цветом) и DIII (показан фиолетовым цветом) нет близких контактов (рисунок 3.26А). Ближайшие аминокислотные остатки Trp214 и Glu450 находятся на расстоянии 5 Å. Как было отмечено выше, при связывании диазепама в сайте

Садлоу II КСА молекула диазепама отталкивает боковой радикал Arg485, он теряет водородную связь с Glu450. Освободившийся Glu450 «разворачивается» в сторону домена DII и сближается с Trp214, после 10 нс симуляции расстояние между Glu450 и Trp214 составляет 4 Å (в начальной точке – 7 Å). Asp451 вслед за Glu450 сближается с доменом DII, после 10 нс симуляции между Asp451 и Lys199 образуется водородная связь (рисунок 3.26Б). После изменения конформации Lys199 в сайте Садлоу I освобождается пространство возле аминокислотного остатка Gln196, и нитрогруппа параоксона меняет свое положение, занимая эту нишу. После 10 нс симуляции один из атомов кислорода нитрогруппы параоксона образует водородную связь с атомом водорода остова Gln196.



**Рисунок 3.26** – Влияние связывания диазепама (DIA) в сайте Садлоу II ЧСА на взаимодействие параоксона (POX) с сайтом Садлоу I ЧСА по данным МД. А – конформация аминокислот сайтов Садлоу и POX в отсутствие диазепама, Б – конформация аминокислот сайтов Садлоу и POX в присутствии диазепама. Остов ЧСА показан в виде ленты, домен DI – серым цветом, домен DII – коричневым цветом, домен DIII – фиолетовым цветом.

В случае ЧСА, диазепам связывается в сайте Садлоу II в такой конформации, которая не приводит к изменению конформации Arg485 и дальнейшей цепочке

конформационных изменений. Поэтому связывание диазепама в сайте Садлоу II ЧСА существенно не влияет на положение параоксона в сайте Садлоу I.

На следующем этапе из траекторий молекулярной динамики были оценены значения свободных энергий образования комплексов ЧСА и КСА с диазепамом и параоксоном, характеризующие сродство альбумина к этим лигандам. Полученные значения представлены в таблице 3.13.

**Таблица 3.13** – Значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов ЧСА и КСА с диазепамом в сайте Садлоу II и параоксоном сайте Садлоу I в присутствии и отсутствие друг друга

	Диазепам в отсутствие параоксона	Диазепам в присутствии параоксона	Параоксон в отсутствие диазепама	Параоксон в присутствии диазепама
ЧСА	-28.6±2.3	-27.1±2.4	-20.8±2.5	-20.9±2.6
КСА	-30.7±1.8	-30.1±2.2	-22.4±2.0	-12.0±3.4 *

\* –  $p < 0.05$

Параоксон практически не влияет на сродство ЧСА и КСА по отношению к диазепаму, что согласуется с данными, ранее полученными нами и другими исследователями, о том, что сайт Садлоу II слабо подвержен модуляции. Можно также отметить, что, согласно полученным данным, сродство диазепама к КСА лучше, чем к ЧСА. Ранее нами экспериментальными методами было показано, что КСА лучше ЧСА связывает ибупрофен [64]. Диазепам не влияет на сродство сайта Садлоу I ЧСА к параоксону, но существенно ухудшает сродство сайта Садлоу I КСА (таблица 3.13). Для ЧСА и КСА сродство сайта Садлоу II к диазепаму выше, чем к параоксону. Это означает, что диазепам будет выигрывать у параоксона борьбу за связывание с сайтом Садлоу II и таким образом ингибировать псевдоэстеразную реакцию в сайте. Этот результат согласуется с нашими экспериментальными данными, указывающими на конкурентное ингибирование диазепамом гидролиза НФА в сайте Садлоу II. Таким образом, можно ожидать, что

диазепам по-разному будет действовать на альбумин человека и крысы, межвидовые различия следует учитывать при разработке адъювантной терапии отравления ФОС.

При исследовании влияния карбоксима на (псевдо)эстеразную активность альбумина не было обнаружено снижения скорости гидролиза НФА. Напротив, скорость гидролиза НФА возрастала пропорционально увеличению концентрации карбоксима. В таких условиях применение модели ингибирования не представляется возможным. В данном случае была применена модель кинетики Михаэлиса-Ментен с расчетом констант для каждого эксперимента в отдельности. Значения кинетических характеристик представлены в таблицах 3.14 и 3.15.

**Таблица 3.14** – Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для первой стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (предстабилизированное состояние, кинетика сайта Садлоу II)

	Концентрация карбоксима, мкМ				
	0.0	63.6	127.3	271.0	408.0
$V_{max}$ , мкМ/мин	2.4±0.4	34.3±12.4	52.2±10.9	~ 2.976e+015	52.5±4.1
$K_M$ , мкМ	136.2±47.3	1373±581.7	1309±321.7	~ 6.086e+016	736.9±75.01
$R^2$	0.7889	0.9977	0.9992	0.9936	0.9996

**Таблица 3.15** – Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для второй стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (стабилизированное состояние, кинетика сайта Садлоу I)

	Концентрация карбоксима, мкМ				
	0.0	63.6	127.3	271.0	408.0
$V_{max}$ , мкМ/мин	2.3±0.3	6.6±0.6	9.8±0.2	19.5±1.2	21.0±1.0
$K_M$ , мкМ	192.0±55.6	247.3±38.2	260.4±9.1	528.9±46.9	493.6±32.2
$R^2$	0.8775	0.9961	0.9998	0.9995	0.9997

Механизм этого явления и роль альбумина в терапевтическом эффекте реактиваторов при отравлении ФОС требует дальнейшего изучения.

#### 4. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые методом  $^1\text{H}$  ЯМР показано, что сывороточный альбумин обладает истинно эстеразной активностью по отношению к НФА и НФП. Нами показано, что скорость образования продуктов гидролиза НФА и НФП в присутствии БСА выше, чем в случае их спонтанного гидролиза. Образование продуктов истинно эстеразной активности БСА (ацетата в случае НФА и пропионата в случае НФП) начинается не позднее, чем через 10 мин после добавления раствора субстрата к раствору белка. Известно, что период полураспада ацетилированного тирозина в основном сайте псевдоэстеразной активности альбумина Садлоу II составляет  $61 \pm 4$  ч. Для других сайтов ацетилирования для образования аддуктов с ацетатом требуется не менее 30 мин. Совокупность этих фактов свидетельствует о наличии в молекуле альбумина центра истинно эстеразной активности, отличного от сайта псевдоэстеразной активности. Методами молекулярного моделирования мы показали, что сайт Садлоу I БСА с каталитическим Tyr149 (Tyr150 в ЧСА) является наиболее вероятным кандидатом на роль эстеразного центра альбумина.

В эксперименте *in vitro* окисление тиоловой группы Cys34 БСА усиливает связывание НФА в сайте Садлоу I, но уменьшает значение  $V_{\max}$ . В эксперименте *in silico* окисление тиоловой группы влияет на конформацию параоксона в сайте Садлоу I БСА и усиливает связывание лиганда в сайте. Мы полагаем, что стабильность продуктивных комплексов отражает соотношение констант скорости  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_{-1}$  и  $k_{-2}$ , согласно схеме 1 определяющих значение  $K_M^{app}$ : чем стабильнее продуктивная конформация и меньше значение  $\text{distC-O}$ , тем выше сродство (аффинность) и прочность фермент-субстратного комплекса, т.е.  $(k_1 + k_2) \gg (k_{-1} + k_{-2}) \approx k_3$ . В этом ключе наши данные *in silico* согласуются с данными *in vitro* для сайта Садлоу I БСА и для НФА или параоксона в качестве субстратов. В

эксперименте *in vitro* окисление тиоловой группы Cys34 БСА ослабляет связывание НФА в сайте Садлоу II, но не влияет на скорость реакции. В эксперименте *in silico* окисление тиоловой группы не влияет на конформацию параоксона в сайте Садлоу II БСА и не оказывает существенного влияния на сродство сайта к параоксону; вероятно, в данном случае  $(k_1 + k_2) \approx (k_{-1} + k_{-2}) \gg k_3$ . При исследовании ЧСА в нашем эксперименте *in silico* окисление Cys34 влияло на конформацию параоксона в сайте Садлоу I, но не влияло на сродство сайта к лиганду; предложен баланс  $k_1 + k_2 > (k_{-1} + k_{-2}) > k_3$ . Так же, как и для БСА, окисление тиоловой группы не влияло на конформацию параоксона в сайте Садлоу II и не влияло на сродство сайта к лиганду. Согласно же литературным данным, в условиях *in vivo* окисление альбумина оказывает существенное влияние на его связывающие свойства в обоих сайтах Садлоу. В условиях *in vivo* альбумин связан с ЖК, которые, по всей видимости, играют важную роль в регуляции антиоксидантных свойств альбумина. Впервые к такому выводу пришли Грызунов с соавторами [68]. Связывание ЖК создает предпосылки для одновременной регуляции двух важных функций белка: транспортной и антиоксидантной [68]. Согласно полученным нами данным, ЖК обладают выраженным ингибирующим действием в отдаленный период процесса гидролиза НФА в присутствии БСА, то есть оказывают ингибирующий эффект на эстеразную активность альбумина в сайте Садлоу I. Иной результат был получен в случае ЧСА и КСА. Олеиновая кислота способна оказывать ингибирующее влияние на псевдокаталитическую активность сайта Садлоу II альбуминов человека и крысы. Анализ данных выявил неконкурентный тип ингибирования. При этом не было выявлено эффекта ингибирования эстеразной реакции в сайте Садлоу I. Полученный результат может быть связан с тем, что ЧСА обладает более высокой пластичностью и гибкостью в растворе при взаимодействии с ЖК по сравнению с БСА.

Анализ данных, полученных при инкубировании БСА с НФА в присутствии ЭГКГ выявил его активирующее влияние на скорость гидролиза НФА альбумином. Действие ЭГКГ на скорость гидролиза параоксона и НФА бычьим альбумином

оказалось схожим: активность обоих сайтов альбумина значительно усиливалась. По данным молекулярного моделирования, полифенол резвератрол существенно не влияет на эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II. Полученный результат указывает на то, что сайт Садлоу II альбумина слабо подвержен аллостерической модуляции полифенолами, связывающимися в сайте Садлоу I. Поэтому воздействовать на альбумин (на сайт Садлоу I) можно лишь теми полифенолами, которые могут связываться и в сайте Садлоу II, как ЭГКГ. Связь полученного результата с защитным эффектом ЭЗЧ при отравлении ФОС [5] предстоит выяснить.

Как отмечалось выше, концентрация диазепама, при которой он может оказывать модулирующий эффект на альбумин, существенно превышает терапевтическую концентрацию диазепама в плазме крови. Однако в биохимических экспериментах диазепам нередко используют в качестве специфического ингибитора сайта Садлоу II, и тот факт, что этот бензодиазепин может оказывать аллостерический эффект на связывающую активность сайта Садлоу I, следует принимать во внимание при проведении экспериментов *in vitro*. Карбоксим же, напротив, при отравлении ФОС вводится в концентрациях, сопоставимых с концентрацией альбумина в кровеносном русле. Поэтому его активирующий эффект на (псевдо)эстеразную активность белка представляет большой интерес и требует дальнейшего изучения.

Без сомнения, применяемые в данной работе методики имеют ряд ограничений. Так, с помощью метода ЯМР можно качественно увидеть выход продукта истинно эстеразной реакции, катализируемой альбумином, однако стандартные настройки не позволили нам количественно определить кинетические характеристики данной реакции. Это связано с тем, что, если учитывать время спин-решеточной релаксации ядер исследуемых групп, сканирование одной временной точки занимает несколько минут, за которые может существенно измениться концентрация продукта. Требуется кропотливый подбор параметров сканирования, который бы позволил с наименьшей погрешностью количественно

оценить кинетические параметры эстеразной активности альбумина с помощью ЯМР. Это является нашей задачей для предстоящих исследований.

Что касается проведенных биохимических экспериментов, в них мы не учитывали такое явление как молекулярный краудинг. В живых системах, в отличие от экспериментов *in vitro*, биохимические процессы протекают в среде, содержащей высокие концентрации макромолекул (50–400 мг/мл). В частности, в плазме крови человека плотность белковых макромолекул в норме достигает 90 мг/мл. Из-за плотной среды объем доступного растворителя уменьшается, что может повлиять на структуру белка, укладку, форму, конформационную стабильность, ферментативную активность, на связывание малых молекул, взаимодействие белков между собой и с нуклеиновыми кислотами, может вызвать патологическую агрегацию [92]. Эффект краудинга был продемонстрирован и для альбумина с помощью рамановской спектроскопии: плотная среда влияет на прочность внутримолекулярных водородных связей в молекуле БСА, в результате чего молекула приобретает более компактную структуру [119]. Таким образом, можно предположить, что константы связывающей и эстеразной активности альбумина в кровотоке будут отличаться от констант, измеренных в «идеальном растворе» в экспериментах *in vitro* и *in silico*. В связи с этим стоит подчеркнуть важность разработки тест-систем, моделирующих активность альбумина в условиях молекулярного краудинга.

Компьютерное моделирование также имеет ряд ограничений. Для расчета энергии системы наиболее широко используется метод атом-атомных потенциалов или метод молекулярной механики, в котором, в отличие от квантово-механического приближения, молекула рассматривается не как совокупность ядер и электронов, а как система атомов, законы взаимодействия между которыми описываются эмпирически установленными функциями. Основной недостаток молекулярной механики состоит в том, что с помощью этого приближения невозможно адекватно смоделировать образование и разрыв ковалентных связей, таутомеризацию, изменение состояния протонирования в процессе симуляции.

Основные ограничения в расчете свободной энергии связывания связаны с отсутствием точных оценок энергии сольватации и энтропии. Поэтому только совместное применение расчетных и экспериментальных методик, которые дополняют и уточняют друг друга, могут дать полное представление о взаимодействии биологических молекул.

Таким образом, полученные в результате настоящей работы данные позволяют сделать следующие выводы:

1) Кинетика образования ацетата в реакционной смеси в присутствии БСА, зарегистрированная с помощью технологической платформы ЯМР-спектроскопии, свидетельствует о наличии у альбумина истинно эстеразной активности по отношению к НФА. Дополнительное применение методологии молекулярного моделирования позволило установить, что сайтом эстеразной активности альбумина является сайт Садлоу I с каталитическим Tyr149 (Tyr150 в ЧСА).

2) Окисление тиоловой группы БСА ослабляет аффинность сайта Садлоу II к НФА, но не влияет на положение молекулы НФА в этом сайте и значение скорости  $V_{max}$ . Окисление тиоловой группы БСА усиливает аффинность сайта Садлоу I к НФА и уменьшает величину  $V_{max}$ , ослабляя таким образом истинно эстеразную активность белка.

3) В условиях *in vitro* жирные кислоты оказывают ингибирующий эффект на эстеразную активность альбумина в сайте Садлоу I исключительно БСА. В случае ЧСА и КСА, олеиновая кислота способна оказывать неконкурентное ингибирующее влияние на псевдокаталитическую активность сайта Садлоу II. При этом не было выявлено эффекта ингибирования эстеразной реакции в сайте Садлоу I. Согласно данным молекулярного моделирования, основной вклад в изменение связывающей способности альбумина вносят стерические эффекты.

4) ЭГКГ оказывает активирующее влияние на скорость гидролиза НФА альбумином в сайте Садлоу I, снижая кажущуюся  $K_M$  и повышая  $k_{cat}$ . Влияние полифенолов на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II выражается в незначительном увеличении  $K_S$  и понижении кажущейся  $K_M$ . Результат

молекулярного моделирования согласуется с экспериментальными данными: сайт Садлоу II альбумина слабо подвержен аллостерической модуляции полифенолами, связывающимися в сайте Садлоу I.

5) Исследование компонентов антидотной терапии острых отравлений органофосфатами показало, что антиконвульсант диазепам может конкурентно ингибировать не только псевдоэстеразную реакцию в сайте Садлоу II, но также эстеразную реакцию в сайте Садлоу I. По данным молекулярного моделирования, сродство диазепама к КСА выше, чем к ЧСА, что следует учитывать при разработке адьювантной терапии отравления ФОС. Реактиватор карбоксим усиливает скорость гидролиза НФА в токсикологически релевантных концентрациях.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CBDP	4H-1,3,2-Benzodioxaphosphorin, 2-(2-methylphenoxy)-, 2-oxide
cysBCA	Цистеинилированный бычий сывороточный альбумин
distC-O (distP-O)	Расстояние между карбоксильным атомом углерода (атомом фосфора) лиганда и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина альбумина
DMSO d6	Дейтерированный диметилсульфоксид
DSS	Триметилсилилпропансульфонат натрия
IBU	Ибупрофен
MM-PBSA	Molecular mechanics - Poisson Boltzmann surface area (метод, сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-Больцмана)
PDB	Protein Data Bank (база данных белковых структур)
PON-1	Параоксоназа-1
RMSD	Root mean square deviation, среднеквадратичное отклонение
SDS	додецилсульфат натрия
WRF	Варфарин
АХЭ	Ацетилхолинэстераза
BCA	Сывороточный альбумин быка
БХЭ	Бутирилхолинэстераза
ДТНБ	5,5-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота)
ДТТ	Дитиотреитол

ЖК	Жирные кислоты
КСА	Сывороточный альбумин крысы
КЭ	Карбоксилэстераза
мБСА	Неокисленный (меркапто-) бычий сывороточный альбумин
МД	Молекулярная динамика
НТЭ	Нейротоксичная эстераза
НФА	<i>n</i> -Нитрофенилацетат
НФП	<i>n</i> -Нитрофенилпропионат
ОК	Олеиновая кислота
ОФ	Оценочная функция
ПК	Пальмитиновая кислота
РСА	Рентгеноструктурный анализ
СА	Сывороточный альбумин
ФОС	Фосфорорганические соединения
ФБ	Фосфатно-солевой буфер
ЧСА	Сывороточный альбумин человека
ЭГКГ	Эпигаллокатехин-3-галлат
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭЗЧ	Экстракт зеленого чая

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Теоретические и прикладные аспекты эстеразной активности альбумина. // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46. – № 3. – С. 247-260.
2. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана. // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40. – № 5. – С. 541–549.
3. Бобров К.С. Рекомбинантная  $\alpha$ -галактозидаза из супертермофильной бактерии *thermotoga maritima*: исследование кинетических и структурных свойств. Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Гатчина, Россия, 2019.
4. Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О ферментативной активности альбумина. // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41. – № 2. – С. 131.
5. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Белинская Д.А., Соболев В.Е., Шмурак В.И., Корф Е.А., Авдонин П.В. Крыса (*rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Системный анализ эффективности экстракта зеленого чая в качестве средства предупреждения отставленных последствий отравления. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019а. – Т. 55. – № 3. – С. 188-198.
6. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Биохимические аспекты. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019б. – Т. 55. – № 2. – С. 104-114.

7. Грызунов Ю.А. Свойства связывающих центров альбумина: метод исследования в биологических жидкостях и опыт его применения для оценки состояния организма. Диссертация на соискание учёной степени кандидата наук, Москва, Россия, 2003.
8. Ионин Б.И. ЯМР-спектроскопия в органической химии. / Б. И. Ионин – Ленинград: Химия, 1983. Вып. 2–е изд., перераб. – 269с.
9. Пырков Т.В., Озеров И.В., Балицкая Е.Д., Ефремов Р.Г. Молекулярный докинг: роль невалентных взаимодействий в образовании комплексов белков с нуклеотидами и пептидами. // Биоорганическая химия. – 2010. – Т.36. – №4. – С.482-492.
10. Рапапорт Д.К. Искусство молекулярной динамики. / Рапапорт Д.К. , Дьяконова А.Н. (пер. с англ.) , Ефремов Р.Г. (науч. ред.). – М. , Ижевск : Ин-т компьютер. исслед., 2012. – 630 с. – Пер. изд. : The art molecular dynamics simulation / Rapaport D.C. 2d ed. Cambridge : Cambridge univ. press, cop. 2004. Библиогр.: с. 591-605. Список функций, предм. указ. : с. 606-630. – ISBN 978-5-4344-0083-1.
11. Таборская К.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Построение трехмерной модели молекулы крысиного альбумина методом гомологичного моделирования. // ЖЭБФ. – 2017. – Т. 53. – № 5. – С. 342-350.
12. Шмурак В.И. Сравнительный анализ связывающей и эстеразной активности сывороточного альбумина человека, быка и крысы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Россия, Санкт-Петербург, 2018.
13. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. // SoftwareX. – 2015. – 1–2. – 19–25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001

14. Acosta-Silva C., Bertran J., Branchadell V., Oliva A. Kemp Elimination Reaction Catalyzed by Electric Fields. // *Chemphyschem.* – 2020. – 21(4). – 295–306. doi:10.1002/cphc.201901155
15. Adcock S.A., McCammon J.A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. // *Chem Rev.* – 2006. – 106(5) – 1589-615. doi: 10.1021/cr040426m
16. Al-Harhi S., Lachowicz J.I., Nowakowski M.E., Jaremko M., Jaremko Ł. Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin. // *J. Inorg. Biochem.* – 2019. – 198. – 110716. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110716
17. Ali S.T., Karamat S., Kóňa J., Fabian WM. Theoretical prediction of pKa values of seleninic, selenenic, sulfinic, and carboxylic acids by quantum-chemical methods. // *J. Phys. Chem. A.* – 2010. – 114(47). – 12470-12478. doi:10.1021/jp102266v
18. Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. // *Pharm Res.* – 2001. – 18(5) – 632-9. doi: 10.1023/a:1011029226072
19. Antoni G., Casagli M.C., Bigio M., Borri G., Neri P. Different interactions of human and bovine serum albumin with Cibacron Blue and Blue Dextran // *Ital. J. Biochem.* – 1982. – V. 31. – P. 100-106.
20. Ascenzi P., Fasano M. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin // *Biophys. Chem.* – 2010. – V.148. – P.16-22.
21. Ascenzi P., Fasano M. Pseudo-enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl myristate by human serum albumin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2012. – V.422. – №2. – P.219-223.
22. Aubry A.F., Markoglou N., McGann A. Comparison of drug binding interactions on human, rat and rabbit serum albumin using high-performance displacement chromatography // *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* – 1995. – V. 112. – P. 257-266.

23. Bajaj P., Tripathy R.K., Aggarwal G., Pande A.H. Human paraoxonase 1 as a pharmacologic agent: limitations and perspectives. // *Scientific World Journal*. – 2014. – V. 2014. – e854391. doi: 10.1155/2014/854391
24. Bar-Or D., Bar-Or R., Rael L.T., Gardner D.K., Slone D.S., Craun M.L. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. // *Crit. Care Med.* – 2005. – V. 33(7) – P.1638–1641.
25. Barzegar A., Moosavi-Movahedi A.A., Sattarahmady N., Hosseinpour-Faizi M.A., Aminbakhsh M., Ahmad F., Saboury A.A., Ganjali M.R., Norouzi P. Spectroscopic studies of the effects of glycation of human serum albumin on L-Trp binding // *Protein Pept. Lett.* – 2007. – V. 14. – P. 13-18. doi: 10.2174/092986607779117191
26. Belinskaia D.A., Terpilovskii M.A., Batalova A.A., Goncharov N.V. Effect of Cys34 oxidation state of albumin on its interaction with paraoxon according to molecular modeling data. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2019. – V.45. – P. 535–544.
27. Belinskaya D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Shmurak V.I., Avdonin P.P., Avdonin P.V. In silico analysis of paraoxon binding by human and bovine serum albumin. // *J. Evol. Biochem. Phys.* – 2017. – 53(3). –191–199. doi: 10.1134/S0022093017030036
28. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. // *J. Chem. Phys.* – 1984. – 81. – 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118
29. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermolecular Forces*. // The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, Pullman, B., Ed. – Springer: Dordrecht, the Netherlands – 1981. – V.14. – P. 331–342.
30. Bertucci C., Nanni B., Raffaelli A., Salvadori P. Chemical modification of human albumin at cys34 by ethacrynic acid: Structural characterisation and binding properties. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – V.18. – P.127–136.

31. Black R.M. Harrison J.M., Read R.W. The interaction of sarin and soman with plasma proteins: the identification of a novel phosphonylation site. // *Arch. Toxicol.* – 1999. – V.73. – P.123-126.
32. Briggs G.E., Haldane J.B.S. A note on the kinetics of enzyme action. // *Biochem J.* – 1925. – V.19. – №2. – P.338-339.
33. Brown N.A., Müller W.E. Binding of coumarin anticoagulants to human and bovine serum albumin. Circular dichroism studies. // *Pharmacology.* – 1978. – V. 17. P. – 233-238.
34. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2012. – V.68. – №10. – P.1278-89.
35. Buller A.R., Townsend C.A. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – V.110. – P.653-661.
36. Bussi G., Zykova-Timan T., Parrinello M. Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. // *J. Chem. Phys.* – 2009. – 130(7). – 074101. doi: 10.1063/1.3073889
37. Casida J.E., Augustinsson K.B. Reaction of plasma albumin with I-naphthyl N-methylcarbamate and certain other esters. // *Biochim Biophys Acta.* – 1959. – V.36. – P.411-426.
38. Chauhan B., Kumar G., Kalam N., Ansari S.H. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* – 2013. – V.4. – P.4-8.
39. Collier H. B. A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. // *Anal. Biochem.* – 1973. – Vol. 56. – P. 310-311.
40. Costa M., Horrillo R., Ortiz A.M., Perez A., Mestre A., Ruiz A., Boada M., Granca S. Increased Albumin Oxidation in Cerebrospinal Fluid and Plasma from Alzheimer's Disease Patients. // *J. Alzh. Dis.* – 2018. –V. 63. – P. 1395-1404.

41. Cui Q. Perspective: Quantum mechanical methods in biochemistry and biophysics. // *J Chem Phys.* – 2016. – 145(14). – 140901. doi: 10.1063/1.4964410
42. Danesh N., Navaee Sedighi Z., Beigoli S., Sharifi-Rad A., Saberi M.R., Chamani J. Determining the binding site and binding affinity of estradiol to human serum albumin and holo-transferrin: fluorescence spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular modeling approaches // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2018. – V. 36. – P. 1747-1763. doi: 10.1080/07391102.2017.1333460
43. Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. // *J. Chem. Phys.* – 1993. – 3. – 10089-10092. doi: 10.1063/1.464397
44. Dasgupta A., Crossey M.J. Elevated free fatty acid concentrations in lipemic sera reduce protein binding of valproic acid significantly more than phenytoin. // *Am. J. Med. Sci.* – 1997. – 313(2). – 75-79. doi:10.1097/00000441-199702000-00001
45. De Simone G., di Masi A., Ascenzi P. Serum Albumin: A Multifaced Enzyme. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – 22. – 10086. doi:10.3390/ijms221810086
46. De Vriese C., Hacquebard M., Gregoire F., Carpentier Y., Delporte C. Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. // *Endocrinology.* – 2007. – V.148. – P.2355-2362.
47. Di Simplicio P., Frosali S., Priora R., Summa D., Cherubini Di Simplicio F., Di Giuseppe D., Di Stefano A. Biochemical and biological aspects of protein thiolation in cells and plasma. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2005. – 7(7-8). – 951-963. doi:10.1089/ars.2005.7.951
48. Dodson G., Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. // *Trends Biochem. Sci.* – 1998. – V.23. – №9. – P.347-352.
49. Dubois-Presle N., Lapicque F., Maurice M.H., Fournel-Gigleux S., Magdalou J., Abiteboul M., Siest G., Netter P. Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide. // *Mol. Pharmacol.* – 1995. – V.47. – P.647-653.

50. Duran M., Blau N., Blaskovics M.E., Gibson K.M. Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Handling. // *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*: Springer. – 2003. – 309-34.
51. Eaton J.D., Williamson M.P. Multi-site binding of epigallocatechin gallate to human serum albumin measured by NMR and isothermal titration calorimetry. // *Biosci. Rep.* – 2017. – 37(3). doi:10.1042/BSR20170209
52. Ekici O.D., Paetzel M., Dalbey R.E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. // *Protein science: a publication of the Protein Society* 17. – 2008. – V.12. – P.2023-2037.
53. Exnowitz F, Meyer B, Hackl T. NMR for direct determination of  $K(m)$  and  $V(max)$  of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves. // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – 1824(3). – 443-9. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.011
54. Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. // *IUBMB Life.* – 2005. – V.57. – №12. – P.787-796.  
<https://doi.org/10.1080/15216540500404093>
55. Favia A.D., Nobeli I., Glaser F., Thornton J.M. Molecular docking for substrate identification: the short-chain dehydrogenases/reductases. // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V.375. – №3. – P.855-874.
56. Flach E., Schnell S. Use and abuse of the quasi-steady-state approximation. // *IEE Proc Syst Biol.* – 2006. – V.153 – №4. – P.187-191.
57. Fonda M.L., Trauss C., Guempel U.M. The binding of pyridoxal 5'-phosphate to human serum albumin. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – V. 288. – P. 79-86.
58. Frandsen P.C., Brodersen R. Bilirubin/rat serum albumin interaction. // *Acta Chem. Scand. B.* – 1986. – V. 40. – P. 55-59.
59. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. // *Biotechniques* – 1993. – 14(6). – 1010-1013.

60. Funk W.E., Li H., Iavarone A.T., Williams E.R., Riby J., Rappaport S.M. Enrichment of cysteinyl adducts of human serum albumin. // *Anal. Biochem.* – 2010. – 400(1). – 61-8.
61. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. // *Expert. Opin. Drug. Discov.* – 2015. – 10(5). – 449-461. doi: 10.1517/17460441.2015.1032936
62. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V.353. – №1. – P.38-52. doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075
63. Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I., Terpilowski M.A., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Serum Albumin Binding and Esterase Activity: Mechanistic Interactions with Organophosphates. // *Molecules.* – 2017a. – 22. – 1201. doi: 10.3390/molecules22071201
64. Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Belinskaya D.A., Shmurak V.I., Avdonin P.V. Comparative analysis of esterase and paraoxonase activities of different serum albumin species. // *J. Evol. Biochem. Physiol.* – 2017b. – 53(4). – 271–281. doi: 10.1134/S0022093017040032
65. Gray J.E., Doolittle R.F. Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin. // *Protein Sci.* – 1992. – 1. – 289–302. doi:10.1002/pro.5560010211
66. Grigoryan H., Li H., Iavarone A.T., Williams E.R., Rappaport S.M. Cys34 Adducts of Reactive Oxygen Species in Human Serum Albumin. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – 25. – 1633-1642.
67. Grounds M.D., Terrill J.R., Al-Mshhdani B.A., Duong M.N., Radley-Crabb H.G., Arthur P.G. Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: Myonecrosis, inflammation and oxidative stress. // *Dis. Model. Mech.* – 2020. – 13. – 043638.
68. Gryzunov Y.A., Arroyo A., Vigne J.L., Zhao Q., Tyurin V.A., Hubel C.A., Gandley R.E., Vladimirov Y.A., Taylor R.N., Kagan V.E. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from

- antioxidants to prooxidants. // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – 413(1). – 53-66. doi:10.1016/s0003-9861(03)00091-2.
69. Guzzi R, Bartucci R. Interactive multiple binding of oleic acid, warfarin and ibuprofen with human serum albumin revealed by thermal and fluorescence studies. // Eur Biophys J. – 2022. – 51(1). – 41-49. doi: 10.1007/s00249-021-01582-w
70. Hameduh T., Haddad Y., Adam V., Heger Z. Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. // Comput Struct Biotechnol J. – 2020. –18. – 3494-3506. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.007
71. Han X., Snow T.A., Kemper R.A., Jepson G.W. Binding of Perfluorooctanoic Acid to Rat and Human Plasma Proteins. // Chem. Res. Toxicol. – 2003. – V. 16. – P. 775-781.
72. Harper M.E., Dugaiczuk A. Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. // Am J Hum Genet. – 1983. –V. 35. – P. 565–572.
73. He X.M., Carter D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. // Nature. – 1992. – V.358. – P. 209-215.
74. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. // J. Comp. Chem. – 1997. – V.18. – P. 1463–1473.
75. Hevener K.E., Zhao W., Ball D.M., Babaoglu K., Qi J., White S.W., Lee R.E. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. // J. Chem. Inf. Model. – 2009. – V.49. – №2. – P.444-460.
76. Hofer P., Fringeli U.P. Acetylcholinesterase kinetics. // Biophys. Struct. Mech. – 1981. – V.8. – P.45-59.
77. Ikegaya K., Nokihara K., Yasuhara T. Characterization of sulfhydryl heterogeneity in human serum albumin and recombinant human serum albumin

- for clinical use. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. –74(11). – 2232-2236.  
doi:10.1271/bbb.100423
78. Ishtikhar M., Ahmad E., Siddiqui Z., Ahmad S., Khan M.V., Zaman M., Siddiqi M.K., Nusrat S., Chandel T.I., Ajmal M.R., Khan R.H. Biophysical insight into the interaction mechanism of plant derived polyphenolic compound tannic acid with homologous mammalian serum albumins. // *Int J Biol Macromol.* – 2018. – 107(Pt B). – 2450-2464. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.136
79. Iwao Y., Ishima Y., Yamada J., Noguchi T., Kragh-Hansen U., Mera K., Honda D., Suenaga A., Maruyama T., Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants // *IUBMB Life.* – 2012. – V.64. – P.450-454.
80. Jacob R.B., Michaels K.C., Anderson C.J., Fay J.M., Dokholyan N.V. Harnessing Nature's Diversity: Discovering organophosphate bioscavenger characteristics among low molecular weight proteins. // *Sci Rep.* – 2016. – 6. – 37175. doi: 10.1038/srep37175
81. Jacobsen J., Brodersen R. Albumin-bilirubin binding mechanism. // *J Biol Chem.* – 1983. – 258(10). – 6319-26.
82. Jang B.K. Elevated serum bilirubin levels are inversely associated with nonalcoholic fatty liver disease. // *Clin Mol Hepatol.* – 2012. – 18(4). –357-9. doi: 10.3350/cmh.2012.18.4.357
83. John H., Breyer F., Thumfart J.O., Höchstetter H., Thiermann H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides and G- and V-type nerve agents. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – V.398. – P.2677-2691.
84. Junge W., Krisch K. Current problems on the structure and classification of mammalian liver carboxylesterases (EC 3.1.1.1). // *Mol. Cell Biochem.* – 1973. – V.1. – №1. – P.41-52.

85. Klammt S., Mitzner S., Stange J., Brinkmann B., Drewelow B., Emmrich J., Liebe S., Schmidt R. Albumin-binding function is reduced in patients with decompensated cirrhosis and correlates inversely with severity of liver disease assessed by model for end-stage liver disease. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – V.19. – P. 257-263.
86. Kohita H., Matsushita Y., Moriguchi I. Binding of carprofen to human and bovine serum albumins. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. – 1994. – V. 42. – P. 937-40.
87. Kosa T., Maruyama T., Otagiri M. Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites. // *Pharm. Res.* – 1997. – V.14. – №11. – P.1607-1612.
88. Kumari R., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g\_mmpsa GROMACS tool for high-throughput MM-PPSA calculations. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2014. – 54(7). – 1951-1962. doi:10.1021/ci500020m
89. Kurano M., Yasukawa K., Ikeda H., Aoki J., Yatomi Y. Redox state of albumin affects its lipid mediator binding characteristics. // *Free Radic. Res.* – 2019. – 53. – 892–900. doi: 10.1080/10715762.2019.1641603
90. Kurono Y., Miyajima M., Tsuji T., Yano T., Takeuchi T., Ikeda K. Esterase-like activity of human serum albumin. VII. Reaction with p-nitrophenyl 4-guanidino-benzoate. // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 1991. – V.39. – №5. – P.1292-1294.
91. Kuzmic P. Application of the Van Slyke-Cullen irreversible mechanism in the analysis of enzymatic progress curves. // *Anal. Biochem.* – 2009. – V.394. – P.287-289.
92. Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. What macromolecular crowding can do to a protein. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – 15. – 23090–230140. doi:10.3390/ijms151223090
93. Kwon C.H., Maddison K., LoCastro L., Borch R.F. Accelerated decomposition of 4-hydroxycyclophosphamide by human serum albumin. // *Cancer Res.* – 1987. – V.47. – P.1505-1508.

94. Latruffe N., Menzel M., Delmas D., Buchet R., Lançon A. Compared binding properties between resveratrol and other polyphenols to plasmatic albumin: consequences for the health protecting effect of dietary plant microcomponents. // *Molecules*. – 2014. – V. 19. – P. 7066-17077.
95. Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B., Gillon E., Schopfer L.M., Lockridge O. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – 21. – 421-431. doi:10.1021/tx700339m
96. Li B., Sedlacek M., Manoharan I., Boopathy R., Duysen E.G., Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. // *Biochem Pharmacol.* – 2005. – V.70. – №11. – P.1673-1684.
97. Liu X, Zhang H, Liang J. Blood urea nitrogen is elevated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. // *Hepatogastroenterology*. – 2013 – V. 60(122). – P. 343-345.
98. Liu Y., Gong S., Ye L., Li J., Liu C., Chen D., Fang M., Letcher R.J., Su G. Organophosphate (OP) diesters and a review of sources, chemical properties, environmental occurrence, adverse effects, and future directions // *Environ. Int.* – 2021. – V. 155. – e106691. doi: 10.1016/j.envint.2021.106691
99. Lockridge O., Xue W., Gaydoss A., Grigoryan H., Ding S.J., Schopfer L.M., Hinrichs S.H., Masson P. Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – №33. – P.22582-90
100. Lotosh N.Y., Savel'ev S.V., Selishcheva A.A. Modification of albumin with different degrees of the oxidation of SH-groups in the reaction with glucose // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2016. – V. 42. – P. 624–630. doi:10.1134/S1068162016050101
101. Lyskov S., Chou F.C., Conchúir S.Ó., Der B.S., Drew K., Kuroda D., Xu J., Weitzner B.D., Renfrew P.D., Sripakdeevong P., Borgo B., Havranek J.J., Kuhlman B., Kortemme T., Bonneau R., Gray J.J., Das R. Serverification of

- molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE). // PLoS One. – 2013. – 8(5). – e63906.  
doi:10.1371/journal.pone.0063906
102. Maciążek-Jurczyk M, Szkudlarek A, Chudzik M, Pożycka J, Sułkowska A. Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review // Spectrochim Acta A. Mol Biomol Spectrosc. – 2018. – 188. – 675-683. doi: 10.1016/j.saa.2017.05.023
  103. Macwilliam J.A. Remarks on a New Test for Albumin and Other Proteids // Br. Med. J. – 1891. – V.1. – P.837-840.
  104. Majorek K.A., Porebski P.J., Dayal A., Zimmerman M.D., Jablonska K., Stewart A.J., Chruszcz M., Minor W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. // Mol. Immunol. – 2012. – V.52. – №3. – P.174-182.
  105. Maliwal B.P., Guthrie F.E. Interaction of insecticides with human serum albumin. // Mol. Pharmacol. – 1981. – V.20. – P.138-144.
  106. Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 494. – P. 107–120. doi: 10.1016/j.abb.2009.12.00
  107. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. Dynamics of folded proteins. // Nature. – 1977. – V.267. – №5612. – P.585-590.
  108. Means G.E., Bender M.L. Acetylation of human serum albumin by p-nitrophenyl acetate. // Biochemistry. – 1975. – V.14. – №22. – P. 4989-4994.
  109. Michaelis L., Menten M. L. Die kinetik der invertinwirkung. // Biochem. Z. – 1913. – V.49. – P.333-69.
  110. Mohammadi F., Bordbar A.K., Divsalar A., Mohammadi K., Saboury A.A. Analysis of binding interaction of curcumin and diacetylcurcumin with human and bovine serum albumin using fluorescence and circular dichroism spectroscopy. // Protein J. – 2009. – V. 28. – P.189-196.

111. Morrison J.F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1969. – V.185 – P.269-286.
112. Mourik J., de Jong L.P. Binding of the organophosphates parathion and paraoxon to bovine and human serum albumin. // *Arch. Toxicol.* – 1978. – V.41. – P.43-8.
113. Mukherjee S., Mukherjee N., Saini P., Roy P., Babu S.P. Ginger extract ameliorates phosphamidon induced hepatotoxicity. // *Indian J. Exp. Biol.* – 2015. – V. 53. – № 9. – P. 574-584.
114. Nagumo K., Tanaka M., Chuang V.T., Setoyama H., Watanabe H., Yamada N., Kubota K., Tanaka M., Matsushita K., Yoshida A., Jinnouchi H., Anraku M., Kadowaki D., Ishima Y., Sasaki Y., Otagiri M., Maruyama T. Cys34-Cysteinylated Human Serum Albumin Is a Sensitive Plasma Marker in Oxidative Stress-Related Chronic Diseases. // *PLoS One*. – 2014. – 9. – e85216. doi: 10.1371/journal.pone.0085216
115. Nakae H., Tomida K., Kikuya Y., Okuyama M., Igarashi T. Comparison of quality of human serum albumin preparations in two pharmaceutical products. // *Acute Med. Surg.* – 2017. – 4(3). – 251-254. doi: 10.1002/ams2.259
116. Nasif W.A., Mukhtar M.H., El-Emshaty H.M., Alwazna A.H. Redox State of Human Serum Albumin and Inflammatory Biomarkers in Hemodialysis Patients with Secondary Hyperparathyroidism During Oral Calcitriol Supplementation for Vitamin D. // *Open Med. Chem. J.* – 2018. – 12. – 98-110.
117. Nolte W., Hartmann H., Ramadori G. Glucose metabolism and liver cirrhosis. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* – 2009. – 103. – 63-74.
118. Oetl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. // *Br J Pharmacol.* – 2007. – 151(5). – 580-90. doi: 10.1038/sj.bjp.0707251
119. Ota C., Takano K. Behavior of Bovine Serum Albumin Molecules in Molecular Crowding Environments Investigated by Raman Spectroscopy. // *Langmuir*. – 2016. – 32. – 7372–7382. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01228

120. Peters Jr. T. All about albumin. / Biochemistry, genetics, and medical applications. London: Academic Press Ltd. – 1996.
121. Pistolozzi M., Bertucci C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: a circular dichroism study. // *Chirality* – 2008. – 20(3-4). – 552-8. doi: 10.1002/chir.20521
122. Poole L.B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – 80. –148-157. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013
123. Qi L., Cao C., Hu L., Chen S., Zhao X., Sun C. Metabonomic analysis of the protective effect of quercetin on the toxicity induced by mixture of organophosphate pesticides in rat urine. // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2017. –V. 36. – № 5. – P. 494-507.
124. Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. // *Hepatology.* – 2005. – V.41. – P.1211–1219.
125. Rabbani G., Ahn S.N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – 123. – 979-990. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053
126. Rael L.T., Leonard J., Salottolo K., Bar-Or R., Bartt R.E., Wagner J.C., Bar-Or D. Plasma Oxidized Albumin in Acute Ischemic Stroke Is Associated with Better Outcomes. // *Front. Neurol.* – 2019. – V.10. – P. 709.
127. Rainsford K.D., Ford N.L., Brooks P.M., Watson H.M. Plasma aspirin esterases in normal individuals, patients with alcoholic liver disease and rheumatoid arthritis: characterization and the importance of the enzymic components. // *Eur. J. Clin. Investg.* – 1980. – V.10. – P.413-420.
128. Reichenwallner J., Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – 1830(12). – 5382-5393. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.031
129. Rizzuti B., Bartucci R., Sportelli L., Guzzi R. Fatty acid binding into the highest affinity site of human serum albumin observed in molecular dynamics simulation.

- // Arch. Biochem. Biophys. – 2015. – 579. –18-25.  
doi:10.1016/j.abb.2015.05.018
130. Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. // FEBS Lett. – 2008. – V.582. – P.1783-1787.
131. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. // Biochimie – 2011. – 93(4). – 645-58.  
doi:10.1016/j.biochi.2010.12.003
132. Röthlisberger D., Khersonsky O., Wollacott A.M., Jiang L., DeChancie J., Betker J., Gallaher J.L., Althoff E.A., Zanghellini A., Dym O., Albeck S., Houk K.N., Tawfik D.S., Baker D. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. // Nature – 2008. – 453. –190–195. doi:10.1038/nature06879
133. Sakamoto S., Komatsu T., Ueno T., Hanaoka K., Urano Y. Fluorescence detection of serum albumin with a turnover-based sensor utilizing Kemp elimination reaction. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – 27. – 3464–3467.  
doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.076
134. Sakurai Y., Ma S.F., Watanabe H., Yamaotsu N., Hirono S., Kurono Y., Kragh-Hansen U., Otagiri M. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. // Pharm Res. – 2004. – V.21. – №2. – P.285-292.
135. Sakurama K., Nishi K., Chuang V.T.G., Hashimoto M., Yamasaki K., Otagiri M. Effects of Oxidation of Human Serum Albumin on the Binding of Aripiprazole. // Biol. Pharm. Bull. – 2020. – V.43. – P.1023–1026.
136. Salvi A., Carrupt P., Mayer J.M., Testa B. Esterase-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acid. // Drug. Metab. Dispos. – 1997. – V.25. – P.395-398.
137. Sanchez E., Lu S., Reed C., Schmidt J., Forconi M. Kemp Elimination in Cationic Micelles: Designed Enzyme-Like Rates Achieved through the Addition of Long-Chain Bases. // J. Phys. Org. Chem. – 2016. – 29. – 185–189.  
doi:10.1002/poc.3515

138. Sand K.M., Bern M., Nilsen J., Noordzij H.T., Sandlie I., Andersen J.T. Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. // *Front Immunol.* – 2015. – V.5. – №682. doi:10.3389/fimmu.2014.00682
139. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. // *Mol Syst Biol.* – 2011. – V.7. – P.539.
140. Silva D., Cortez C.M., Cunha-Bastos J., Louro S.R. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. // *Toxicol. Lett.* – 2004. – V. 147. – P. 53-61.
141. Song X., Jensen M.Ø., Jogini V., Stein R.A., Lee C.H., Mchaourab H.S., Shaw D.E., Gouaux E. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. // *Nature.* – 2018. – 556(7702). – 515-519. doi: 10.1038/s41586-018-0039-9
142. Strauss A.W., Bennett C.D., Donohue A.M., Rodkey J.A., Alberts A.W. Rat liver pre-proalbumin: complete amino acid sequence of the pre-piece. Analysis of the direct translation product of albumin messenger RNA. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1977. – V.252. – №19. – P.6846-6855.
143. Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. *Biochemistry.* /International Edition. – 2006.
144. Sudlow G., Birkett D.J, Wade D.N. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. // *Mol Pharmacol.* – 1975. – 11(6). – 824-32.
145. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. // *Protein Eng.* – 1999. – V.12. – P.439-446.
146. Suzuki Y., Suda K., Matsuyama Y., Era S., Soejima A. Close Relationship Between Redox State of Human Serum Albumin and Serum Cysteine Levels in

- Non-Diabetic CKD Patients With Various Degrees of Renal Function. // *Clin. Nephrol.* – 2014. – 82(5). – 320-325. doi: 10.5414/CN108040
147. Szkudlarek A, Wilk M, Maciążek-Jurczyk M. In Vitro Investigations of Acetohexamide Binding to Glycated Serum Albumin in the Presence of Fatty Acid. // *Molecules* – 2020. – 25(10). – 2340. doi: 10.3390/molecules25102340.
148. Tabata F., Wada Y., Kawakami S., Miyaji K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – 10(4). – 503. doi: 10.3390/antiox10040503
149. Takahashi T., Terada T., Arikawa H., Kizaki K., Terawaki H., Imai H., Itoh Y., Era S. Quantitation of Oxidative Modifications of Commercial Human Albumin for Clinical Use. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2016. – 39(3). – 401-408. doi: 10.1248/bpb.b15-00843
150. Tildon J.T., Ogilvie J.W. The esterase activity of bovine mercaptalbumin. The reaction of the protein with p-nitrophenyl acetate. // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V.247. – №4. – P.1265-1271.
151. Tove S.B. The esterolytic activity of serum albumin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1962. – V.5. – P.230-235
152. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. // *J. Comput. Chem.* – 2010. – 31(2). – 455-461. doi: 10.1002/jcc.21334
153. Turell L., Radi R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. // *Free Radic. Biol.* – 2013. – Med 65. – 244-253. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050
154. Uchida H., Hanano M. Conformational changes of human serum albumin by binding of small molecules. // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 1974. – 1571-9. doi: 10.1248/cpb.22.1571
155. Ueno S.I., Hatano T., Okuzumi A., Saiki S., Oji Y., Mori A., Koinuma T., Fujimaki M., Takeshige-Amano H., Kondo A., Yoshikawa N., Nojiri T., Kurano M., Yasukawa K., Yatomi Y., Ikeda H., Hattori N. Nonmercaptalbumin as an

- oxidative stress marker in Parkinson's and PARK2 disease. // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* – 2020. – V.7. – P. 307-317.
156. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V.43. – P.204-212.
157. Van Der Vusse G.J. Albumin as Fatty Acid Transporter. // *Drug Metab. Pharmacokinet.* – 2009. – V.24. – P.300-307.
158. Vorum H., Honoré B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1996. – 48(8). – 870-875. doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb03990.x
159. Walker C.H., Mackness M.I. Esterases: problems of identification and classification. // *Biochem Pharmacol.* – 1983. – V.32. – №22. – P.3265-3269.
160. Watanabe H., Tanase S., Nakajou K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. Role of Arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. // *Biochem. J.* – 2000. – V.20. – №349. – P.813-819.
161. Williams N.H., Harrison J.M., Read R.W., Black R.M. Phosphorylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. // *Arch. Toxicol.* – 2007. – V.81. – P.627-639.
162. Yadav P., Jadhav S.E., Kumar V., Kaul K.K., Pant S.C., Flora S.J. Protective efficacy of 2-PAMCl, atropine and curcumin against dichlorvos induced toxicity in rats. // *Interdiscip. Toxicol.* – 2012. – V. 5. – № 1. – P.1-8.
163. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. // *Int J Mol Sci.* – 2014. – 15(3). – 3580-95. doi: 10.3390/ijms15033580
164. Ylianttila M.S., Pursiainen N.V., Haapalainen A.M., Juffer A.H., Poirier Y., Hiltunen J.K., Glumoff T. Crystal structure of yeast peroxisomal multifunctional enzyme: structural basis for substrate specificity of (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase units. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V.358. – №5. – P.1286-1295.

165. Zdražilová P., Stepánková S., Vránová M., Komers K., Komersová A., Cegan A. Kinetics of total enzymatic hydrolysis of acetylcholine and acetylthiocholine. // *Z. Naturforsch C.* – 2006. – V.61. – P.289-294.
166. Zhang Y., Kua J., McCammon J.A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. // *J. Am. Chem. Soc.* –2002. –124(35). – 10572-10577. doi:10.1021/ja020243m
167. Zsila F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model // *Mol. Pharm.* – 2013. – V. 10. – P. 1668-1682. doi: 10.1021/mp400027q