

На правах рукописи



БАТАЛОВА

Анастасия Александровна

**МОДУЛЯЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА**

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2022 г.

Работа выполнена в лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Научный руководитель: **Гончаров Николай Васильевич**
доктор биологических наук,
зав. лабораторией Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Муронец Владимир Израилевич**
доктор биологических наук, профессор
зав. отделом НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Соколов Алексей Викторович
доктор биологических наук,
зав. лабораторией ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____. на заседании диссертационного совета 24.2.318.08 при ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу: 295007, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, зал защиты диссертаций (аудитория 301). Тел.: +7(3652) 54-50-36; факс: 54-52-46; E-mail: cf_university@mail.ru.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу: 295007, Республика Крым, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4, корпус А и на сайте университета <https://science.cfuv.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
24.2.318.08, к.б.н., доцент

Д.Р. Хусаинов

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
мBCA	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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Сывороточный альбумин (СА) является мажорным белком крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500-700 мкМ. Связывая многие лекарственные препараты и токсические вещества, СА вносит весомый вклад в их фармако- и токсикокинетику. Предположение о том, что СА обладает гидролитической активностью, было выдвинуто в научной литературе в конце 1950-х. С того времени накапливаются данные об эстеразной (связывание субстрата с активным центром альбумина с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) и псевдоэстеразной (необратимое ковалентное связывание субстрата с белком) активности СА (Гончаров и др., 2015; De Simone et al., 2021). Тем не менее, молекулярные механизмы гидролитической активности СА до конца не определены, и их изучение является актуальной задачей современной биохимии. В токсикологии наибольший интерес представляет проблема (псевдо)эстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС), поскольку ФОС широко используются в сельском хозяйстве и промышленности в качестве пестицидов, пластификаторов, в синтезе лекарственных веществ, полимеров (Liu et al., 2021).

Для молекулы СА характерна аллостерическая модуляция – связывание лиганда в одном сайте влияет на связывание и/или скорость гидролиза в другом сайте (Ascenzi, Fasano, 2010). Имеются данные о том, что в молекуле альбумина происходят конформационные изменения после связывания некоторых эндогенных соединений, переносимых кровяным потоком, таких как билирубин, мочевины, эстрадиол, глюкоза, жирные кислоты (ЖК). В кровеносном русле примерно 30% молекул СА являются окисленными по тиоловой группе Cys34 (Di Simplicio et al., 2005), а при некоторых патологических состояниях организма процент окисленных молекул может достигать 70% (Nagumo et al., 2014). Известно, что окисление Cys34 изменяет трехмерную структуру альбумина и влияет на связывание фармпрепаратов и токсических веществ (Maciążek-Jurczyk et al., 2018). Показан вклад альбумина в эффект лекарственных взаимодействий (Yang et al., 2014). При изучении аллостерических эффектов в СА необходимо принимать во внимание межвидовые различия, поскольку биохимические эксперименты нередко проводят на дешёвом бычьем альбумине, а доклиническое тестирование – на грызунах.

Таким образом, не вызывает сомнений важность получения информации о механизмах модуляции связывающей и ферментативной активности альбумина. Проблема того, как реальные условия, различные ксенобиотики и нутрицевтики влияют на функциональные свойства СА, является актуальной. Направленное воздействие на альбумин с помощью молекул, модулирующих его связывающие и/или эстеразные свойства, может стать способом стехиометрической и/или каталитической детоксикации ФОС в кровеносном русле, а также решать многие другие задачи в токсикологии или фармакологии.

Степень разработанности темы исследования.

В настоящее время можно найти много работ, посвящённых ферментативной активности СА. Однако большинство исследователей, обсуждая гидролитическую активность белка, говорят о псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II с каталитическим Tyr411, а экспериментальный факт наличия истинно эстеразной активности у альбумина связывают с медленным деацилированием Tyr411. Лишь в единичных работах говорится о активных центрах, отвечающих за два вида активности, – истинно и псевдоэстеразной. Механизм работы сайта истинно эстеразной реакции не изучен. Эффекты аллостерической модуляции СА активно изучаются. Однако в работах, посвященных этому вопросу, исследуют в основном влияние

модуляторов на взаимодействие СА с фармпрепаратами. В литературе практически не встречаются работы, посвященные модуляции ферментативных свойств альбумина, и практически никто не рассматривал возможность модуляции эстеразных свойств СА в контексте влияния на токсикокинетику ФОС. Исследования, связанные с разработкой средств детоксикации ФОС на первом этапе поступления яда в организм, направлены в основном на получение рекомбинантных биочистильщиков: бутирилхолинэстеразы (БХЭ) для стехиометрического и параоксоназы 1 (PON1) для каталитического взаимодействия с ФОС (Masson, Lockridge, 2010; Vajaj et al., 2014), однако эти подходы имеют ряд ограничений (Белинская, Гончаров, 2020). Преимущества направленного воздействия на альбумин для усиления терапии отравления ФОС следующие: 1) концентрация СА в плазме крайне высока; 2) трехмерная структура СА лабильна и легко подвержена аллостерической модуляции; 3) СА может связывать практически все биоактивные вещества, а влиять на его активность можно доступными и дешевыми соединениями. Накоплено данные о том, что эффективность взаимодействия различных ксенобиотиков различается для альбуминов человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА), но нет информации о том, существует ли разница в механизмах аллостерической модуляции в молекулах СА разных видов. Эта информация необходима для правильной экстраполяции данных экспериментов *in vitro* и доклинического тестирования на организм человека. Поэтому вопрос о видовых различиях в модуляции функциональных свойств СА требует тщательного изучения. Полученные данные о видовых различиях найдут не только практическое применение, но и позволят получить новую информацию о 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 обезвреживаний 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 перспективы использования 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), еще большее число препаратов находится в стадии разработки и тестирования. Эстеразная активность альбумина может содействовать превращению неактивных пролекарств в активные формы и наоборот. Знания о веществах, способных модулировать свойства альбумина могут оказаться основой для разработки более безопасных и эффективных препаратов для терапии заболеваний или токсических поражений организма. Тот факт, что окисление альбумина ослабляет связывание эфиров с белком, дает основание полагать, что воздействие окислителей будет ослаблять связывание ФОС с альбумином и препятствовать доставке молекул отравляющего вещества к нейрональным и нейромышечным синапсам. В результате 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.

Подготовлены рекомендации по использованию материала диссертации в лекционных курсах «Биохимия» и «Энзимология» для студентов медицинского и биолого-почвенного факультетов СПбГУ.

Методология

В ходе данной работы был использован широкий спектр методов, включающий в себя: протонный ядерно-магнитный резонанс (^1H ЯМР); определение количества свободных тиоловых групп в альбумине с использованием реактива Элмана; определение потери белка при смене буфера методом Бредфорда; электрофорез белков в полиакриламидном геле (объект исследования – БСА); определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии

альбумина методом спектрофотометрии; 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, ММ-РБСА) (объект исследования – БСА, ЧСА и КСА); статистические методы обработки экспериментальных данных, которые включали в себя проверку гипотезы о нормальном распределении с использованием критерия согласия Пирсона и оценку статистической значимости отличий средних величин с помощью t-критерия Стьюдента (в случае определения кинетических констант в условиях *in vitro* выборка состояла из 9 повторов для каждого эксперимента, в случае оценки свободной энергии связывания в эксперименте *in silico* – из 100 измерений для каждой пары белок-лиганд).

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 полученных в ходе данной работы результатов подтверждается применением современных методов исследования, их хорошей воспроизводимостью и согласованностью. 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», Пушкино, 2021.

Личный вклад

Автор принимала участие во всех экспериментах, представленных в данной 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 работ выполнен 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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц, 2 схемы, 35 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (6 глав), описания материалов и методов (8 глав), результатов и обсуждения (8 глав), выводов и списка литературы, включающего 167 литературных источника.

Финансовая поддержка работы

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы, определена научная новизна, охарактеризована теоретическая и практическая значимость полученных результатов, изложены основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены основные сведения об эволюционных, генетических и структурных особенностях альбумина, дано представление о эстеразной и псевдоэстеразной активности белка, подробно описана кинетика ферментативных реакций с участием альбумина. Приведены актуальные данные о модуляции связывающей и ферментативной активности альбумина: механизмах аллостерических эффектов и возможности модулировать активность белка жирными кислотами, полифенолами и редокс-соединениями. Рассмотрены видовые различия в структурных и функциональных характеристиках альбумина. Приведены основные методы изучения связывающей и ферментативной активности альбумина.

Материалы и методы

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 центром «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%.

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 ^1H ЯМР на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III 500 при комнатной температуре (25°C). Для подавления сигнала воды использовали метод «Excitation sculpting».

Определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии альбумина методом спектрофотометрии. Активность альбумина по отношению к НФА определяли спектрофотометрически (405 нм) 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.

Влияние модуляторов на эстеразную активность сывороточного альбумина. Исследование влияния модуляторов (ЖК, мажорного полифенола экстракта зелёного чая (ЭЗЧ) эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ), диазепам и карбоксима) на эстеразную активность альбумина проводили в режиме предварительной инкубации исследуемого модулятора в растворе альбумина в течение 30 минут при $t = 25^\circ\text{C}$. В контрольной пробе содержался фосфатный буфер. Далее скорость гидролиза НФА в присутствии альбумина измеряли на планшетном ридере ClarioStar Plus, BMG Labtech.

Влияние восстановления свободных тиоловых групп БСА на его связывающую и эстеразную активность. Для определения количества свободных тиоловых групп в БСА был использован реактив Элмана (5,5-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота), который вступает в реакцию в стехиометрическом соотношении с тиолами. Количество свободных тиоловых групп в БСА определяли с помощью калибровочного графика, построенного с известными концентрациями цистеина гидрохлорида. Для восстановления свободных тиоловых групп БСА использовали дитиотреитол.

Молекулярное моделирование: подготовка трехмерных моделей. Трёхмерные модели лигандов были построены и оптимизированы методом скорейшего спуска с помощью программы HyperChem 8.0. В качестве трёхмерных моделей ЧСА и БСА использовали данные рентгеноструктурного анализа из базы данных белковых структур (Protein Data Bank, PDB), коды структур 2bxd, 2bxg, 4jk4. Трёхмерная модель КСА была построена ранее методом гомологичного моделирования (Таборская и др., 2017). Для построения моделей окисленного альбумина были описаны топологии окисленного цистеина и добавлены в библиотеку структур аминокислот пакета GROMACS. 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.

Молекулярный докинг. Докинг лигандов в центры связывания альбумина проводили с помощью программного пакета Autodock Vina 1.1.2 (Trott, Olson, 2010) и онлайн версии программы Rosetta (<http://rosie.rosettacommons.org/>) (Lyskov et al., 2013). 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.

Молекулярная динамика. Конформационные изменения комплексов альбумина с лигандами во времени были рассчитаны методом молекулярной динамики с помощью

программного пакета GROMACS (Abraham et al., 2015). Каждый комплекс виртуально был помещен в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. 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.

Оценка свободной энергии связывания. Расчет свободной энергии связывания лигандов с альбумином проводили методом ММ-ПБСА (Genheden, Ryde, 2015) с помощью модуля *g_mmpbsa* (Kumari, Kumar, 2014), встроенного в программный пакет GROMACS. Вклад энтропийного компонента не учитывали. Значение свободной энергии образования комплекса вычисляли с шагом 100 пс в течение симуляции. Итоговое значение рассчитывали как среднее \pm стандартное среднее отклонение.

Статистическая обработка данных. Эксперименты *in vitro* по расчету 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 среднее \pm стандартное среднее отклонение. В экспериментах *in silico* значение свободной энергии образования комплекса вычисляли с шагом 100 пс в течение симуляции, 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.

Результаты и обсуждение

Эстеразная активность сывороточного альбумина по данным ЯМР

При взаимодействии альбумина с НФА реакция проходит в 2 этапа: сначала наблюдается значительное повышение активности, происходит быстрое образование основного продукта реакции – *n*-нитрофенола. Затем система переходит в стационарный режим, но не выходит на плато. На первом этапе взаимодействия субстрат связывается с активным центром белка с образованием фермент-субстратного комплекса, затем высвобождается продукт реакции *n*-нитрофенол, фермент при этом ацетируется. На последнем этапе происходит деацетилирование альбумина и высвобождение ацетата. 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 нитрофенола мы легко регистрируем спектрофотометрически, то ацетатная группа хромогенной не является, и потому регистрация её выхода сопряжена со значительными трудностями. В данном исследовании с помощью метода ^1H ЯМР мы провели качественный анализ выхода ацетата при взаимодействии БСА с НФА и НФП. На рисунке 1 представлена динамика изменения спектра реакционной смеси БСА и НФА.

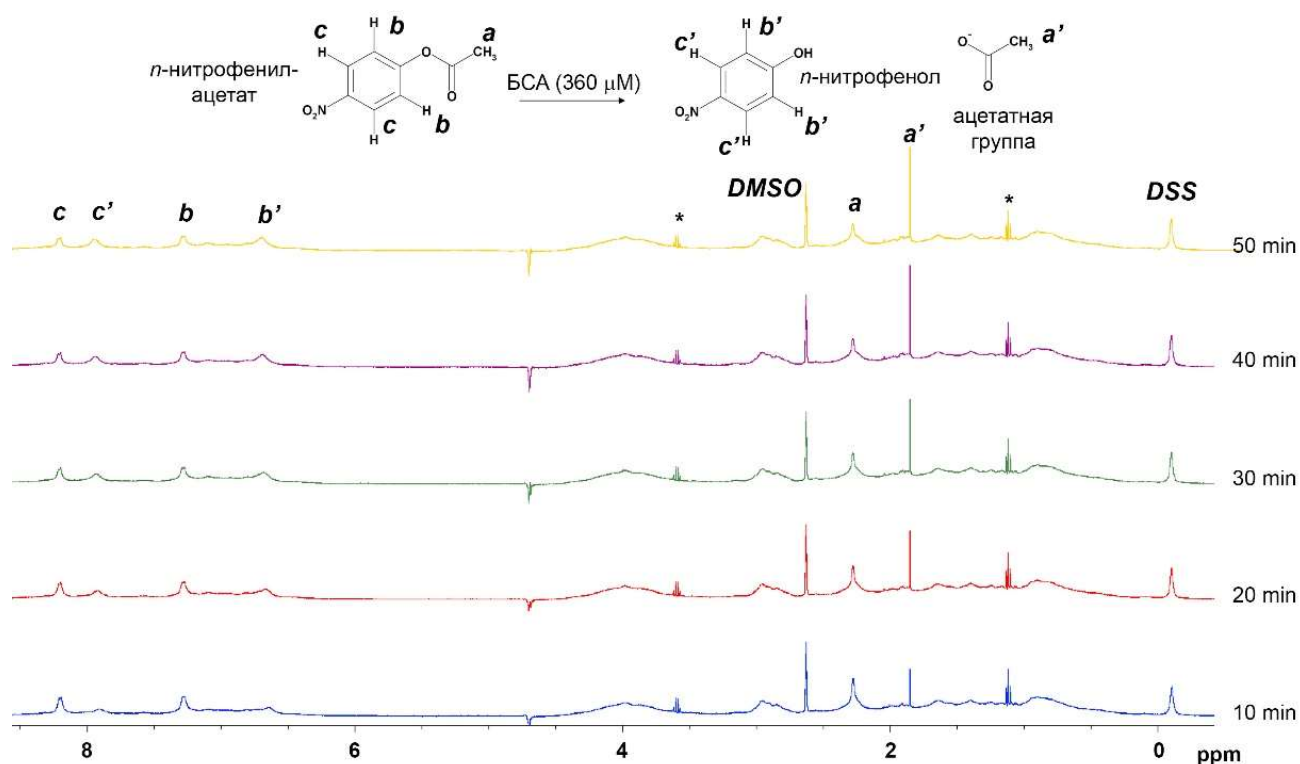


Рисунок 1 – Кинетика гидролиза *p*-нитрофенилацетата (НФА) в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА). Знаком * отмечены низкомолекулярные примеси. DSS – внутренний стандарт триметилсилилпропансульфонат натрия; DMSO – диметилсульфоксид.

В течение 50 минут усиливается интенсивность сигналов **a'** (1.85 ppm), **b'** (6.65 ppm) и **c'** (7.90 ppm), соответствующим продуктам эстеразной реакции, и уменьшается интенсивность сигналов **a** (2.27 ppm), **b** (7.25 ppm) и **c** (8.2 ppm), соответствующим НФА. Накопление ацетата в присутствии БСА происходит значительно интенсивнее по сравнению со спонтанным гидролизом НФА. Дополнительный эксперимент с этопропазином и СВDP (ингибиторами БХЭ и карбоксилэстеразы, соответственно) показал, что эти ингибиторы не влияют на скорость убыви НФА и скорость прироста ацетата. Полученные данные указывают на наличие у альбумина истинно эстеразной активности по отношению к НФА, выявленная гидролитическая активность принадлежит именно альбумину, а не потенциальным примесным эстеразам.

По данным ЯМР-спектроскопии, БСА обладает истинно эстеразной активностью и по отношению к НФП. Как и в случае НФА, скорость спонтанного гидролиза НФП ниже, чем в присутствии БСА, что дополнительно подтверждает наличие истинно эстеразной активности у альбумина в сайте, отличном от сайта псевдоэстеразной активности Садлоу II. На следующем этапе с помощью методов молекулярного моделирования мы попытались выявить этот сайт.

Поиск возможных сайтов истинно эстеразной активности БСА методами молекулярного моделирования

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 (Tyr410 в БСА) 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 (Lockridge et al., 2008). Таким образом,

исключаются все лизины, остаются серины, треонины и тирозины. Методами молекулярного моделирования мы изучили взаимодействие НФА с предполагаемыми центрами эстеразной активности БСА (сайт Садлоу I с потенциальным каталитическим тирозином Tyr149 и сайт III потенциальными каталитическими аминокислотами Tyr137 и Ser192), а также с сайтом псевдоэстеразной активности белка Садлоу II с каталитическим тирозином Tyr410. Методом молекулярной динамики были изучены конформационные изменения комплексов НФА с этими центрами, по полученным траекториям построена зависимость расстояния между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты (distC-O) от времени (рисунок 2).

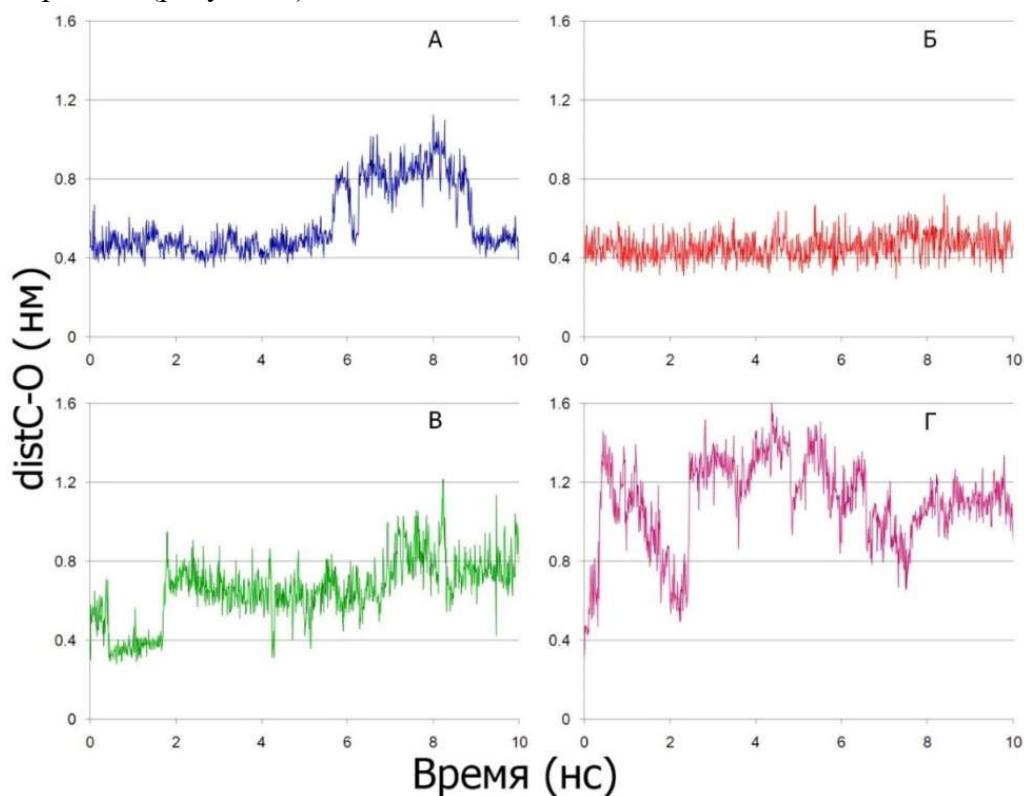


Рисунок 2 – Зависимость от времени расстояния между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты в сайте псевдоэстеразной активности и предполагаемых сайтах эстеразной активности БСА (distC-O). (А) сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, (Б) сайт Садлоу II с каталитическим Tyr411, (В) сайт III с каталитическим Tyr137, (Г) сайт III с каталитическим Ser192.

Согласно полученным данным лишь комплекс НФА с сайтом Садлоу II остается стабильным в течение 10 нс (рисунок 2Б), что в очередной раз подтверждает высокую реактивность Tyr411. Это первая аминокислота, с которой взаимодействует НФА, а стабильность продуктивной конформации способствует быстрому (относительно других аминокислот альбумина) протеканию реакции ацетилирования. Что касается сайта Садлоу I, согласно полученным данным, большую часть времени ориентация НФА относительно аминокислот сайта остаётся неизменной (рисунок 2А). В случае Tyr137 (рисунок 2В) и Ser192 (рисунок 2Г) молекула НФА покидает сайт связывания. На основании совокупности всех этих данных, мы полагаем, что именно сайт Садлоу I с каталитическим Tyr149 (Tyr150 в ЧСА) является сайтом эстеразной активности альбумина.

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

На первом этапе для определения оптимальной концентрации восстановителя была изучена зависимость оптической плотности раствора БСА от количества добавленного ДТТ. Использовали соотношения ДТТ-БСА от 0:1 до 10:1. Полученные данные указывают на то, что на одну молекулу коммерческого БСА (не подвергнувшегося действию ДТТ) приходится 0.42 свободной тиоловой группы, то есть в образце БСА только 58% процентов белка находится в окисленном состоянии. Трехкратного избытка ДТТ по отношению к БСА оказалось достаточно для восстановления максимального количества Cys34, это соотношение и было использовано в дальнейшем для изучения влияния окисления тиоловой группы на функциональные свойства СА. Согласно полученным экспериментальным данным (таблица 1), для первой стадии гидролиза V_{max} практически не зависит от степени окисления белка, тогда как значение K_M уменьшается после восстановления свободных тиоловых групп. 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, НФА более прочно связывается с БСА, но не гидролизуется, что означает замедление истинно эстеразной активности в сайте Садлоу I.

Таблица 1 – 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 *

* – $p < 0.05$

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

Согласно литературным данным (Ikegaya et al., 2010), 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. По полученным траекториям была построена зависимость значения distC-O от времени (рисунок 3). Согласно полученным графикам, молекула НФА остается внутри сайтов Садлоу I (рисунок 3А) и Садлоу II (рисунок 3Б) мБСА на протяжении всего периода симуляции, однако позиция лиганда возле Tyr411 стабильнее и более предпочтительна для нуклеофильной атаки гидроксила 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 на четыре порядка ниже активности сайта Садлоу II (Goncharov et al., 2017).

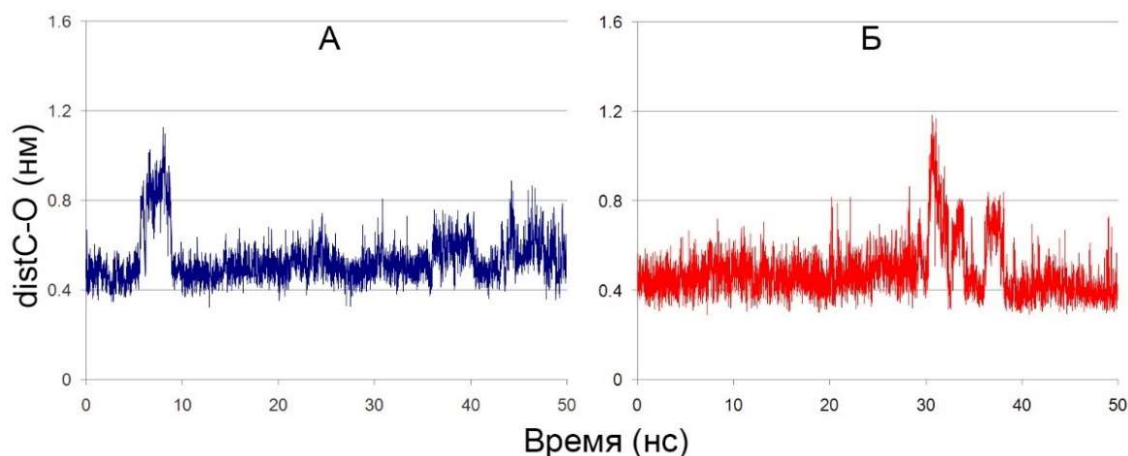


Рисунок 3 – Зависимость от времени расстояния между атомом карбоксильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода каталитического тирозина нативного БСА (distC-O). А – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, Б – сайт Садлоу II с каталитическим Tyr410.

Далее мы изучили взаимодействие НФА с сайтами Садлоу I и Садлоу II цистеинилированного cysБСА. Зависимость distC-O от времени по данным молекулярной динамики представлена на рисунке 4.

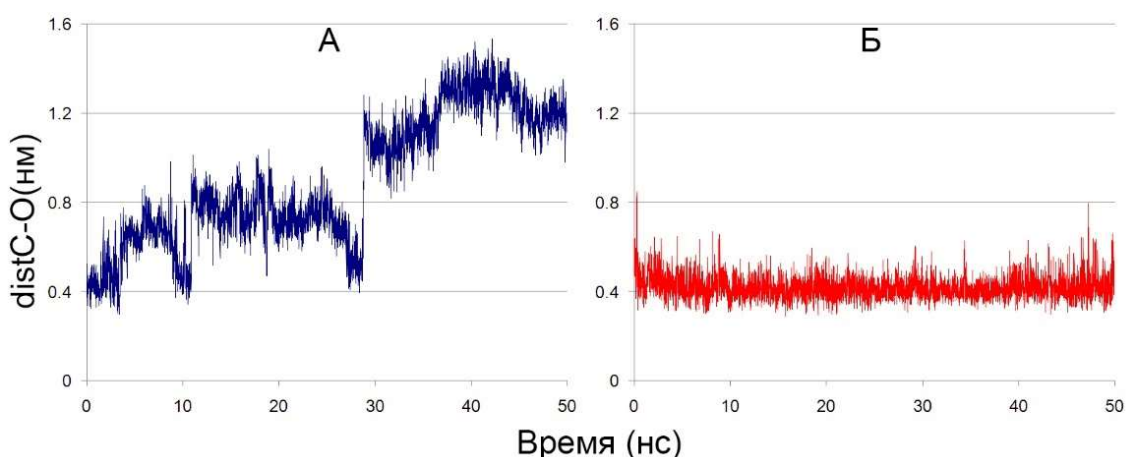


Рисунок 4 – Зависимость от времени расстояния между атомом карбоксильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода каталитического тирозина цистеинилированного БСА (distC-O). А – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr149, Б – сайт Садлоу II с каталитическим Tyr410.

В случае сайта Садлоу I (рисунок 4А), молекула НФА остается возле каталитического тирозина только в течение 5 нс, затем лиганд отдаляется, 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. В промежутке 0-5 нс конформация НФА в сайте Садлоу I cysБСА максимально стабильна, значение distC-O при этом минимально. В случае сайта Садлоу II (рисунок 4Б), молекула НФА остается в одной и той же конформации на протяжении всей траектории. 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.

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. Были подготовлены 12 моделей альбумина, соответствующие разной степени окисления Cys34 (восстановлен, окислен до сульфеновой кислоты, окислен до сульфиновой кислоты) ЧСА и БСА и разной занятости сайтов Садлоу I и Садлоу II параоксоном.

Согласно полученным данным, редокс-статус Cys34 не оказывает существенного влияния на возможность эстеразной и псевдоэстеразной реакций в сайтах Садлоу I и II ЧСА и БСА с участием параоксона в качестве субстрата. Модификация цистеина изменяет конформацию сайта Садлоу I ЧСА и БСА и положение молекулы параоксона внутри сайта. Окисление альбумина не влияет на конформацию сайта Садлоу II ЧСА и БСА и на положение лиганда в этом сайте. С увеличением степени окисления Cys34 усиливается сродство сайта Садлоу I БСА по отношению к параоксону, тогда как сродство сайта Садлоу I ЧСА не зависит от редокс-статуса остатка цистеина (таблица 2).

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 (Kosa et al., 1997; Goncharov et al., 2017; Таборская и др., 2017; Belinskaya et al., 2017; Al-Narhi et al., 2019). Полученные нами данные указывают и на видовые различия во влиянии окисления Cys34 на функциональные свойства альбумина.

Таблица 2 – Оценочные значения свободных энергий ΔG (ккал/моль) образования комплексов ЧСА и БСА с параоксоном в сайтах Садлоу I и Садлоу II.

Сайт	Альбумин	Cys34-SH	Cys34-SOH	Cys34-S(O)O ⁻
Сайт Садлоу I	ЧСА	-20.8±2.5	-20.6±2.0	-20.3±2.0
	БСА	-11.2±3.4	-16.0±6.9	-22.4±3.4 *
Сайт Садлоу II	ЧСА	-25.2±2.8	-26.1±2.2	-24.8±2.4
	БСА	-23.9±3.0	-25.4±3.1	-25.3±2.2

* – $p < 0.05$

Таким образом, 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 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. 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.

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. Согласно полученным данным, жирные кислоты обладают наиболее выраженным ингибирующим действием в отдаленный период процесса гидролиза НФА в присутствии БСА (таблица 3), то есть оказывают ингибирующий эффект на эстеразную активность альбумина в сайте Садлоу I.

Таблица 3 – Кинетические характеристики ингибирующего влияния олеиновой кислоты (K_i , мкМ) на сайты Садлоу альбуминов человека, быка и крысы при использовании НФА в качестве субстрата

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

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. Вычисленная равновесная константа ингибирования K_i сайта Садлоу II КСА оказалась в 5 раз ниже, чем у альбумина человека (таблица 3). При этом не было выявлено эффекта ингибирования эстеразной реакции в сайте Садлоу I. 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 (Goncharov et al., 2017). Полученные в представленном исследовании данные в очередной раз подтверждают этот факт. На следующем этапе методами молекулярного моделирования мы изучили взаимодействие параоксона с сайтами Садлоу I и II ЧСА в отсутствие и присутствии молекулы ОК в сайте FA5 или FA2, которые согласно литературным данным, обладают максимальным сродством к ЖК. 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 ван-дер-Ваальсовых сил.

Влияние полифенолов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина

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 (Eaton, Williamson, 2017). Анализ данных, полученных при инкубировании БСА с НФА в присутствии ЭГКГ (мажорного полифенола ЭЗЧ), выявил активирующее влияние ЭГКГ на скорость гидролиза НФА альбумином (рисунок 5).

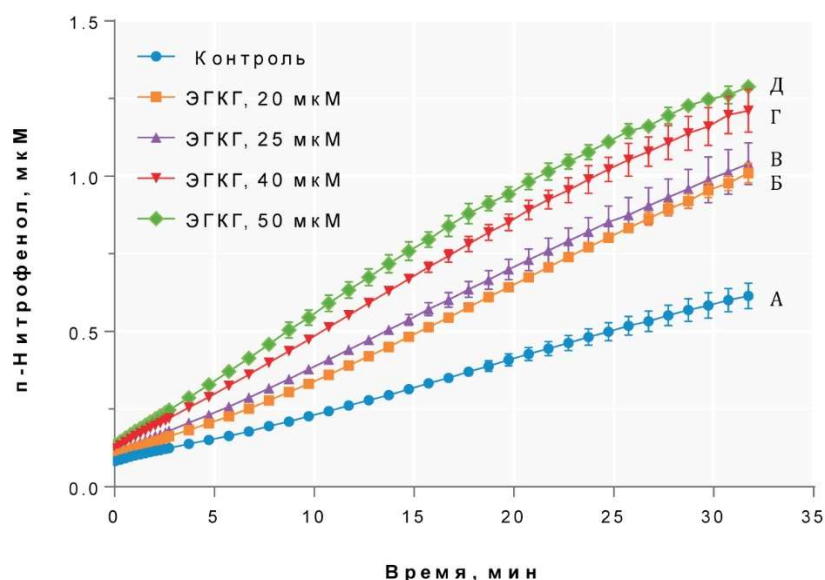


Рисунок 5 – Гидролиз НФА с высвобождением п-нитрофенола, катализируемое БСА в присутствии ЭГКГ. Концентрация альбумина (Е) составляла 10 мкМ, а НФА (S) – 80 мкМ. А – контроль, без добавления ЭГКГ; Б, В, Г, Д – концентрация ЭГКГ 20, 25, 40, 50 мкМ, соответственно.

По полученным концентрационным зависимостям были вычислены кинетические параметры эстеразной реакции в сайте Садлоу I и псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II. 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 повышается в 2.7 раз по сравнению с контролем. Влияние ЭГКГ на псевдоэстеразную активность сайта Садлоу II выражается в незначительном увеличении константы диссоциации K_s и понижении кажущейся константы Михаэлиса K_M^{app} по сравнению с контролем.

Действие ЭГКГ на скорость гидролиза параоксона бычьим альбумином оказалось схожим с НФА: активность обоих сайтов альбумина значительно усиливалась.

Методами *in silico* на примере транс-резвератрола нами было изучено влияние полифенолов на связывание параоксона с ЧСА и КСА. Согласно полученным данным, резвератрол существенно не влияет на эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II. Влияние резвератрола сводится лишь к уменьшению псевдоэстеразной активности КСА по отношению к параоксону. 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, такими как ЭГКГ. Полученный результат частично объясняет некоторый защитный эффект ЭЗЧ

при отравлении ФОС (Гончаров и др., 2019), 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.

Определение влияния диазепама и карбоксима на скорость гидролиза НФА в присутствии БСА

Диазепам и другие бензодиазепины применяют в комплексной терапии 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 ± 21.4 и 169.9 ± 48.7 мкМ для сайтов Садлоу II и Садлоу I, соответственно. Параметр α 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 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. 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 эффект на взаимодействие сайта Садлоу I с лигандами следует иметь в виду.

На следующем этапе 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. По данным конформационного анализа, альбумин крысы более чувствителен к добавлению диазепама. 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. Диазепам не влияет на сродство сайта Садлоу I ЧСА к параоксону, но существенно ухудшает сродство сайта Садлоу I КСА. 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. Таким образом, можно ожидать, что диазепам по-разному будет действовать на альбумин человека и крысы, межвидовые различия следует учитывать при разработке адьювантной терапии отравления ФОС.

При исследовании влияния карбоксима на (псевдо)эстеразную активность альбумина установлено, что 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 (таблицы 4 и 5). Механизм этого явления и роль альбумина в терапевтическом эффекте реактиваторов при отравлении ФОС требует дальнейшего изучения.

Таблица 4 – Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для первой стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (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 5 – Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для второй стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые методом ^1H 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 минут после добавления раствора субстрата к раствору белка. Известно, что период полураспада ацетилированного тирозина в основном сайте псевдоэстеразной активности альбумина Садлоу II составляет 61 ± 4 ч. 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 эту роль.

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 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 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, и таким образом, ЖК, по всей видимости, играют важную роль в регуляции антиоксидантных свойств альбумина. Впервые к такому выводу пришли Грызунов с соавторами (Gryzunov et al., 2003). Связывание ЖК создает предпосылки для одновременной регуляции двух важных функций белка: транспортной и антиоксидантной.

Согласно полученным нами данным, ЖК 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. Иной результат был получен для ЧСА и КСА. ОК 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. Полученные в представленном исследовании данные в очередной раз подтверждают тот факт, что функциональные характеристики ЧСА и КСА отличаются между собой в меньшей степени по сравнению с функциональными характеристиками БСА (Goncharov et al., 2017). Методами молекулярного моделирования было показано, что основные изменения в значениях свободных энергий связывания вносит энергия вандерваальсовых сил.

Анализ данных, полученных при инкубировании БСА с НФА в присутствии ЭГКГ, выявил активирующее влияние ЭГКГ на скорость гидролиза НФА альбумином. Действие ЭГКГ на скорость гидролиза параоксона бычьим альбумином оказалось схожим с НФА: 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. Полученный результат частично объясняет некоторый защитный эффект ЭЗЧ при отравлении ФОС (Гончаров и др., 2019).

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 влиять 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 достоин 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. Требуется кропотливый подбор параметров сканирования, который бы позволил с наименьшей погрешностью количественно оценить кинетические параметры эстеразной активности альбумина с помощью ЯМР. 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 (Kuznetsova et al., 2014). 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 молекулярной механики, который не позволяет 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.

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. Данные молекулярного моделирования позволили заключить, что 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_d 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 при острых отравлениях 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям по данным молекулярного моделирования // Токсикологический вестник. – 2019. – № 3 (156). – С. 26–32.
2. Belinskaia D.A., **Batalova A.A.**, Goncharov N. V. The effect of resveratrol on binding and esterase activity of human and rat albumin // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2019. – V. 55. – P. 174–183.
3. Белинская Д.А., Терпиловский М.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Влияние степени окисления остатка Cys34 альбумина на взаимодействие белка с параоксоном по данным молекулярного моделирования // Биоорг. хим. – 2019. – Т. 45. – № 6. – С. 640–649.
4. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Влияние редокс-статуса бычьего сывороточного альбумина на его взаимодействие с параоксоном по данным молекулярного моделирования // ЖЭБФ – 2020. – Т. 56. – № 3. – С. 98–101.
5. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Shmurak V.I., Vovk M.A., **Batalova A.A.**, Jenkins R.O., Goncharov N.V. The Universal Soldier: Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Functions of Serum Albumin // Antioxidants. – 2020. – V. 9. – E. 966.
6. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Vovk, M.A., Shmurak V.I., **Batalova, A.A.**, Jenkins, R.O., Goncharov, N.V. Esterase Activity of Serum Albumin Studied by ¹H NMR Spectroscopy and Molecular Modelling. // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – V. 22. – E. 10593.
7. Belinskaia D.A., Voronina P.A., **Batalova A.A.**, Goncharov N.V. Serum Albumin // Encyclopedia. – 2021. – V. 1. – P.67–75.

Статьи в реферируемых сборниках

1. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Тестирование полифенолов и жирных кислот в качестве модуляторов эстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям // Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения. Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием. – 2019. – С. 428–434.
2. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей бычьего сывороточного альбумина на его связывающую и псевдоэстеразную активность по данным компьютерного моделирования // В: В.Д. Лахно, (Ред.). Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Пущино. ИМПБ РАН. – 2020. – Т. 8. – Е. 10.
3. Воронина П.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на ферментативную активность бычьего

сывороточного альбумина в эксперименте *in vitro* // В: А.В. Силин, Л.Б. Гайкова, (Ред.). Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине. Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2020. – С. 53–60.

4. Белинская Д.А., Воронина П.А., **Баталова А.А.** Влияние бензодиазепинов на взаимодействие сывороточного альбумина человека с фосфорорганическими соединениями по данным молекулярного моделирования // В: В.А. Степанова, Е.Л. Чойнзонова, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.В. Жданова (Ред.). Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых. – 2020. – С. 465–468.
5. Белинская Д.А., Воронина П.А., Шмурак В.И., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Взаимодействие альбумина с эндотелиальными клетками: гликокаликс, трансцитоз и скавенджер-рецептор CD36 // В: А.В. Бережнов, В.П. Зинченко (Ред.), Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. – 2021. – С. 27–31.

Тезисы конференций

1. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Сравнительный анализ ингибирования альбумина человека, быка и крысы ибупрофеном и варфарином по данным молекулярного моделирования // Сборник тезисов VI молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. – 2018. – С.8-10.
2. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Взаимодействие сывороточного альбумина человека, быка и крысы со специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и Садлоу II по данным молекулярного моделирования //Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. – 2019. – С. 85–86.
3. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В., Шмурак В.И. Проблемы доклинического тестирования препаратов, взаимодействующих с альбумином. //Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. Сборник тезисов докладов пятой Междисциплинарной конференции. – 2019. – С. 140.
4. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Альбумин – интегративный белок плазмы крови. Методология исследования // Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвящённой 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. – 2019. – С.33–34.
5. Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. *In silico* анализ влияния степени окисления альбумина на его связывающую и эстеразную активность по отношению к фосфорорганическим соединениям // Сборник научных трудов, представленных на VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезде биохимиков России и IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды». – 2019. – С. 81–82.
6. **Баталова А.А.**, Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Взаимодействие параоксона с альбуминами человека и быка с различной степенью окисления Cys34: сравнительный анализ методами молекулярного моделирования // Сборник тезисов докладов VII молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 2020 г. – 2020. – С.42–43.
7. Воронина П.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. Роль альбумина в модификации кинетики лекарственных и токсических соединений // В: К.В. Кудрявцев, Е.М. Панина (Ред.). Сборник тезисов докладов 6-й междисциплинарной

конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». – 2020. – С. 11.

8. Белинская Д.А., Воронина П.А., Шмурак В.И., Вовк М.А., Баталова А.А., Гончаров Н.В. Совершенствование методологии доклинического тестирования препаратов, взаимодействующих с альбумином // В: К.В. Кудрявцев, Е.М. Панина (Ред.). Сборник тезисов докладов 7-й междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии», Москва, 12-14 октября 2021 г. М. Перо. – 2021. – С. 8.

Список литературы, цитируемой в автореферате:

- Гончаров Н.В. и др. // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41. – № 2. – С. 131.
Гончаров Н.В. и др. // ЖЭБФ. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 104-114.
Таборская К.И. и др. // ЖЭБФ. – 2017. – Т. 53. – № 5. – С. 342-350.
Abraham M. J. et al. // SoftwareX. – 2015. – 1–2. –19–25.
Al-Harathi S. et al. // J. Inorg. Biochem. – 2019. – 198. –110716.
Ascenzi P., Fasano M. // Biophys. Chem. – 2010. – V.148. – P.16-22.
Belinskaya D.A. et al. // J. Evol. Biochem. Phys. – 2017. – 53(3). –191–199.
De Simone G. et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – 22. – 10086.
Di Simplicio P. et al. // Antioxid. Redox. Signal. – 2005. – 7(7-8). – 951-963.
Eaton J.D., Williamson M.P. // Biosci. Rep. – 2017. –37(3).
Genheden S., Ryde U. // Expert. Opin. Drug. Discov. – 2015. – 10(5). – 449-461.
Goncharov N.V. et al. // J. Evol. Biochem. Physiol. – 2017. – 53(4). – 271–281.
Gryzunov Y.A. et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – 413(1). – 53-66.
Ikegaya K. et al. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2010. –74(11). – 2232-2236.
Kosa T. et al. // Pharm. Res. – 1997. – V.14. – №11. – P.1607-1612.
Kumari R., Kumar R. // J. Chem. Inf. Model. – 2014. – 54(7). – 1951-1962.
Kuznetsova I.M. et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – 15. – 23090–230140.
Liu et al. // Environ. Int. –2021. – V. 155. – e106691
Lockridge O. et al. // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – №33. – P.22582-90
Lyskov S. et al. // PLoS One. – 2013. – 8(5). – e63906.
Maciążek-Jurczyk M. et al. // Spectrochim Acta A. Mol Biomol Spectrosc. – 2018. – 188. – 675-683.
Nagumo K. et al. // PLoS One. – 2014. – 9. – e85216.
Trott O., Olson A. J. // J. Comput. Chem. – 2010. – 31(2). – 455-461.
Yang F. et al. // Int J Mol Sci. – 2014. –15(3). – 3580-95.