

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 577.112+577.322
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2026-70-2-141-152>

Поступило в редакцию 10.10.2025
Received 10.10.2025

В. В. Побойнев, А. Н. Стожаров

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
пр. Дзержинского, 83, 220083, Минск, Республика Беларусь*

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕННЫХ ЛИГАНДОВ
С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА**

(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)

Аннотация. На основании *in silico* экспериментов проанализирована возможность эндогенных лигандов (тироксина, жирных кислот, гема) вытеснять билирубин из его сайта связывания в первом домене сывороточного альбумина человека. По результатам проведенных исследований показано, что сайт связывания в первом домене сывороточного альбумина не является специфическим для билирубина. Константа ингибирования комплекса альбумина и билирубина составила 417,38 мкмоль/л, комплекса альбумина и пальмитиновой кислоты – 164,28 мкмоль/л, комплекса альбумина и гема – 10,13 мкмоль/л, комплекса альбумина и тироксина – 9,17 мкмоль/л. Сделан вывод, что связывание жирных кислот сывороточным альбумином человека должно приводить к изменению пространственной структуры белка и появлению на нем более специфичных сайтов связывания для физиологического изомера билирубина.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, билирубин, молекулярный докинг, сайт связывания, константа ингибирования

Для цитирования. Побойнев, В. В. Взаимодействия эндогенных лигандов с сывороточным альбумином человека / В. В. Побойнев, А. Н. Стожаров // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2026. – Т. 70, № 2. – С. 141–152. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2026-70-2-141-152>

Victor V. Poboinev, Aleksander N. Stojarov

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
83, Dzerzhynsky Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus*

INTERACTIONS OF ENDOGENOUS LIGANDS WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)

Abstract. In this article we have analyzed the possibility of endogenous ligands (thyroxine, fatty acids, heme) displacing bilirubin from its binding site in the first domain of the human serum albumin based on *in silico* experiments. The obtained data showed that the known binding site in the first domain of human serum albumin is not specific for bilirubin. Indeed, the inhibition constant of the albumin and bilirubin complex was 417.38 μM , of the albumin and palmitic acid complex was 164.28 μM , of the albumin and heme complex was 10.13 μM , and of the albumin and thyroxine complex was 9.17 μM . The binding of fatty acids by human serum albumin should lead to changes in the tertiary structure of the protein and the appearance of more specific binding sites for 4Z,15Z-Bilirubin IXa.

Keywords: human serum albumin, bilirubin, molecular docking, binding site, inhibition constant

For citation. Poboinev V. V., Stojarov A. N. Interactions of endogenous ligands with human serum albumin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2026, vol. 70, no. 2, pp. 141–152 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2026-70-2-141-152>

Введение. Трехмерная структура человеческого сывороточного альбумина (далее – альбумин) была получена с помощью рентгеноструктурного анализа в 1992 г., т. е. через 34 года после получения первой трехмерной структуры белка при помощи дифракции рентгеновских лучей [1]. Альбумин синтезируется в печени и секретируется из гепатоцитов в кровь. В эндоплазматическом ретикулуме с N-конца сериновой протеазой отщепляется препропептид. После этого белок транспортируется в аппарат Гольджи, прежде чем в конечном итоге покинет клетку. Первичная структура альбумина, находящегося в крови, включает 585 аминокислотных остатков. К веществам, связываемым альбумином, относятся гидрофобные эндогенные лиганды (билирубин, жирные кислоты, тироксин и др.), а также многочисленные экзогенные молекулы и ионы. На сегодняшний день в той или иной степени изучены сайты связывания для большинства из этих веществ [2–4]. По экспериментальным данным одна молекула альбумина связывает 2 молекулы билирубина, но на единственной структуре сывороточного альбумина с билирубином находится лишь одна молекула билирубина [2; 5]. Для получения данной пространственной структуры авторы инкубировали билирубин и альбумин в мольном соотношении 1,1 к 1 и 3 к 1 [2]. Данный эксперимент четко показал наличие сайта связывания в субдомене IV, а данные для доказательства наличия сайтов связывания в субдоменах IIА и IIIА были неоднозначными [2]. Также известно, что одна молекула альбумина может переносить до четырех молекул тироксина и до 11 молекул жирных кислот [4]. Сайты связывания жирных кислот на альбумине распределены неравномерно, несмотря на симметричную доменную структуру белка [6]. Действительно, сывороточный альбумин человека состоит из трех гомологичных доменов, каждый из которых включает два субдомена (А и В), обладающих общими структурными мотивами [1; 7]. Несмотря на немалые усилия, затраченные на изучение структуры альбумина, до сих пор остается открытым вопрос не только о локализации сайтов связывания билирубина, их количестве, но и о механизмах связывания билирубина с альбумином, о конкуренции между лигандами за сайты связывания на молекуле белка.

Концентрация альбумина в крови у взрослых и у детей от одного года находится в пределах от 35 до 50 г/л, у детей первого года жизни – от 30 до 45 г/л. В норме в крови новорожденного 99 % билирубина связано с альбумином и только 1 % находится в свободном виде [5]. При недоношенности уровень несвязанного с альбумином билирубина способен повышаться [5], что может вызывать ядерную желтуху (билирубиновую энцефалопатию), так как билирубин пересекает гематоэнцефалический барьер. Недоношенным ребенком считается при появлении на свет до 37 полных недель беременности [8]. Согласно статистике, ежегодно в мире около 15 млн детей рождаются недоношенными, т. е. в среднем это каждый 10-й появившийся на свет ребенок. Более одного миллиона из этих детей умирают вскоре после рождения, многие из выживших страдают от различных видов физической и неврологической инвалидности или испытывают проблемы в обучении. В Республике Беларусь ежегодно рождается 4,0–4,5 тыс. детей в сроке до 37 полных недель.

Материалы и методы исследования. Материалом для данного исследования послужили 108 структур сывороточного альбумина человека, находящихся в Protein Data Bank (www.pdb.org). Среди изученных структур аминокислотная последовательность 95 является нативной, т. е. не содержит никаких аминокислотных замен. 15 структур представляют собой комплексы альбумина с эндогенными лигандами: с декановой (каприновой) кислотой (PDB ID: 1E7E), с додекановой (лауриновой) кислотой (PDB ID: 1E7F), с тетрадекановой (миристиновой) кислотой (PDB ID: 1E7G, 1BJ5), с гексадекановой (пальмитиновой) кислотой (PDB ID: 1E7H), с октадекановой (стеариновой) кислотой (PDB ID: 1E7I), с *цис*-9-октадеценовой (олеиновой) кислотой (PDB ID: 1GNI), с *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновой (арахидоновой) кислотой (PDB ID: 1GNJ), с тироксином (PDB ID: 1HK1), с тироксином и миристиновой кислотой (PDB ID: 1HK4), с билирубином (PDB ID: 2VUE), с гемом (PDB ID: 1N5U), с миристиновой кислотой и геминем (PDB ID: 1O9X), с каприновой и лимонной кислотами (PDB ID: 1TF0). Имеется также структура рекомбинантного сывороточного альбумина человека с пальмитиновой кислотой (PDB ID: 4BKE).

Информация о структуре билирубина (bilirubin-IX alpha), тироксина, гема и пальмитиновой кислоты получена из базы данных PubChem (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Для проведения молекулярного докинга билирубина и других лигандов со структурой нативного сывороточного

альбумина человека (PDB ID: 4K2C) использовали программу Molecular Docking server (www.dockingserver.com). При определении энергии связывания билирубина с альбумином в качестве связывателей выбирали те аминокислотные остатки, которые образуют взаимодействия с билирубином как на структуре 2VUE, содержащей единственный, инструментально определенный, сайт связывания билирубина [2]. Для определения характера взаимодействия между эндогенными лигандами и сывороточным альбумином человека использовали алгоритм PLIP – Protein-Ligand Interaction Profiler (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

Результаты и их обсуждение. Только одна структура (PDB ID: 2VUE) из 95 изученных нативных структур сывороточного альбумина человека представляет собой комплекс с билирубином. Это единственная модель, в которой показан так называемый гидрофобный карман, являющийся единственным хорошо описанным сайтом связывания билирубина [2]. 3D структуры, на которых показаны другие сайты связывания билирубина альбумином, пока отсутствуют. При этом нельзя утверждать, что этот единственный сайт связывания билирубина является сайтом связывания того изомера, который синтезируется в организме. Авторы исследования указывают на то, что инкубацию билирубина с альбумином они проводили в темноте, но обработка данных электронной плотности указывает на то, что с альбумином связался не 4Z,15Z-билирубин IX α (синтезируется в организме), а его изомер (4Z,15E-билирубин IX α), образовавшийся из-за воздействия света при проведении эксперимента [2]. С помощью алгоритма PLIP определено, что билирубин взаимодействует исключительно с аминокислотными остатками первого домена альбумина и образует следующие типы взаимодействий: гидрофобные взаимодействия с Leu115, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157, Tyr161, Arg186; водородные связи с Tyr138, Tyr161; катион-пи взаимодействие с Arg186 и солевые мостики с Arg117, Arg186, Lys190 [9]. Рассчитанная энергия взаимодействия альбумина с билирубином в этом сайте связывания согласно докинг-серверу составляет –4,61 ккал/моль, а константа ингибирования – 417,38 мкмоль/л [9].

При сравнении третичной структуры альбумина без лигандов (PDB ID: 4K2C) с третичной структурой, содержащей билирубин (PDB ID: 2VUE), установлено, что данные 3D модели одинаковы на 98,3 %. Единственным отличием является то, что на структуре 2VUE аминокислотные остатки Thr79–Ala88 являются внутренне неструктурированными (IDPR), а на структуре 4K2C они входят в состав петли (Thr79–Glu86) и в состав альфа-спирали (Met87–Lys93). При этом данные структуры получены методом рентгеноструктурного анализа кристалла сывороточного альбумина человека при одном и том же уровне pH и температуре (pH = 7,0, $T = 298$ K). Других отличий между данными структурами не выявлено. Таким образом, можно предположить, что связывание молекулы билирубина альбумином ведет к появлению неструктурированного состояния в этом же домене белка.

Способность связывать еще одну молекулу билирубина формирующейся неструктурированной областью белка Thr79–Ala88 была оценена при помощи молекулярного докинга. Для определения энергии связывания билирубина с данной неструктурированной областью альбумина в качестве связывателей выбрали только те аминокислотные остатки, которые входят в состав неструктурированной области Thr79–Ala88. Энергия связывания составила –5,89 ккал/моль, а константа ингибирования – 47,79 мкмоль/л. Билирубин взаимодействует с Cys75, Thr79, Arg81, Ala88, Asp89, Cys91 и Ala92.

В международном банке данных белков находятся пять структур альбумина с тироксином, но три из них содержат аминокислотные замены, поэтому мы их не включали в выборку и не анализировали. Одна молекула альбумина связывает 4 молекулы тироксина (3D структура с PDB ID: 1HK1). Первая молекула тироксина образует гидрофобные контакты с Trp214, Arg218, Leu238; водородные связи – с Arg218, Arg222, Arg257; галогеновую связь – с Ile290; солевой мостик – с Lys199. Вторая молекула тироксина образует гидрофобные контакты с Leu394, Leu497; водородную связь – с Tyr411; галогеновые связи – с Leu387, Ala406, Ser489. Третья молекула тироксина образует гидрофобные контакты с Lys524, Ala528, Phe551; водородную связь – с Thr508; солевой мостик – с His510. Четвертая молекула тироксина образует гидрофобные контакты с Val547, Phe551; водородную связь – с Ala528; π -взаимодействие с Phe502. Таким образом, связывание тироксина осуществляется аминокислотными остатками из II и III доменов альбумина и не затраги-

вает напрямую структуру сайта связывания билирубина из первого домена белка. Проведя молекулярный докинг тироксина к аминокислотным остаткам из гидрофобного кармана в I домене, мы выяснили, что энергия формирования комплекса альбумина с тироксином намного ниже (–7,94 ккал/моль), чем для комплекса альбумина с билирубином (–4,61 ккал/моль). Константа ингибирования для комплекса с тироксином (9,17 мкмоль/л) в 45,52 раза меньше, чем для комплекса с билирубином! Такие значения констант наталкивают нас на мысль, что тироксин может вытеснить билирубин из его сайта связывания.

Также известно, что билирубин может связываться с областями альбумина, в которых находятся Lys240 и Arg222 [10; 11]. Данные области сывороточного альбумина человека можно рассматривать как второй и третий сайты связывания билирубина соответственно. Кроме взаимодействий с Lys240 билирубин образует контакты с Thr236, Lys233, Glu208 (гидрофобные взаимодействия), с Thr233 (полярные взаимодействия), Asp237, Thr239 (другие типы взаимодействий). Тироксин же не взаимодействует ни с одной из вышеперечисленных аминокислот, т. е. тироксин не может непосредственно повлиять на связывание билирубина альбумином. Кроме полярного взаимодействия с Arg222 билирубин также формирует гидрофобные взаимодействия с Lys444, Ala291, Val293, полярные взаимодействия с Asn295, Arg218, Asp451, Lys199 и другие типы взаимодействий с Glu294, Lys195, Glu292. На структуру третьего возможного сайта связывания билирубина тироксин может оказать влияние, так как первая молекула тироксина образует взаимодействия с теми же аминокислотными остатками, что и билирубин.

При совместной кристаллизации тироксина и миристиновой кислоты одна молекула альбумина связывает 1 молекулу тироксина и 7 молекул миристиновой кислоты. При этом единственная молекула тироксина связывается с областью белка, абсолютно отличной по сравнению с областями, с которыми связываются четыре молекулы тироксина в отсутствие миристиновой кислоты.

Т а б л и ц а 1. Номера аминокислотных остатков сывороточного альбумина человека в комплексе с тироксином, которые формируют взаимодействия с тетрадекановой кислотой

T a b l e 1. Numbers of amino acid residues of human serum albumin in its complex with thyroxine forming interactions with tetradecanoic acid

Номер жирной кислоты из файлов PDB Fatty acid number from the PDB files	Наименование лигандов/идентификатор Ligand name/identifier	
	Тетрадекановая кислота (1E7G) Tetradecanoic acid (1E7G)	Тетрадекановая кислота + тироксин (1HK4) Tetradecanoic acid + thyroxine (1HK4)
1	Arg117, Tyr138, Tyr161, Phe165; <i>Arg117</i>	Tyr138, Leu139, Tyr161; <i>Arg117</i>
2	Phe19, Val23, Leu66, Pro152, Ala254, Leu283; <u>Tyr150, Ser287</u> ; <i>Arg257</i>	Pro152, Ala254; <u>Leu283, Ser287</u> ; <i>Arg257</i>
3	Leu387, Ile388; <u>Ser342</u> ; <i>Arg348, Arg485</i>	Ile388, Ala449; <u>Ser342</u> ; <i>Arg348, Arg485</i>
4	Val415, Leu457, Leu460; <u>Tyr411</u> ; <i>Arg410</i>	Tyr411, Val415, Leu430, Leu460, Phe488; <u>Tyr411</u> ; <i>Arg410</i>
5	Phe502, Leu532, Phe551; <u>Tyr401</u> ; <i>Lys525</i>	Phe502, Phe507, Lys525, Leu532, Met548, Phe551; <u>Tyr401</u> ; <i>Lys525</i>
6	Ala210, Lys212, Ala213, Leu327	Ala210, Ala213, Val216, Leu327
7	Trp214, Arg218, Leu219, Leu238, Ile290	Arg218, Leu238, Leu260, Ile264, Ile290; <u>Arg218</u> ; <i>Lys199</i>

П р и м е ч а н и я: обычным шрифтом обозначены аминокислотные остатки, формирующие гидрофобные взаимодействия с жирными кислотами, подчеркнутым – водородные связи, курсивом – образующие солевые мостики.

N o t e s: the usual font indicates amino acid residues forming hydrophobic interactions with fatty acids, underlined font – hydrogen bonds, and italic font – forming salt bridges.

Единственная молекула тироксина формирует гидрофобные взаимодействия с Ala191, Lys432, Tyr452, Val455, водородные связи – с Glu425, Asn429, солевые мостики – с Arg186, Lys190, Lys432, т. е. связывание жирных кислот изменяет структуру сывороточного альбумина человека, что приводит к исчезновению имеющихся сайтов связывания и появлению нового сайта для тироксина. Связывание же тироксина существенно не влияет на структуру сайтов связывания жирных кислот, так как на 3D моделях с тироксином (3D структура с PDB ID: 1HK4) и без него (3D структура с PDB ID: 1E7G) позиция жирных кислот не меняется, что подтверждается формированием одних и тех же взаимодействий с аминокислотными остатками белка (табл. 1).

При взаимодействии миристиновой кислоты с альбумином (рис. 1, *c, d*), а также при совместном нахождении миристиновой кислоты и тироксина (рис. 1, *a, b*) одна из молекул жирной кислоты занимает известный сайт связывания билирубина в первом домене белка (данная молекула жирной кислоты обведена окружностью).

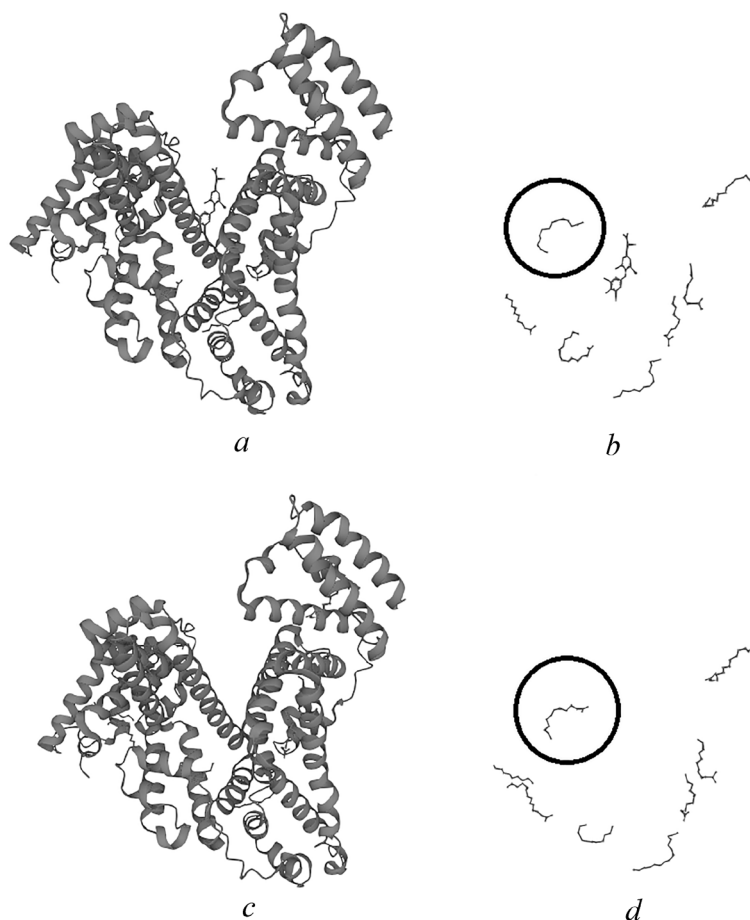


Рис. 1. Взаимодействия сывороточного альбумина человека с миристиновой кислотой: *a* – третичная структура комплекса альбумина, миристиновой кислоты и тироксина; *b* – взаиморасположение молекул миристиновой кислоты и тироксина; *c* – третичная структура комплекса альбумина с миристиновой кислотой; *d* – взаиморасположение молекул миристиновой кислоты

Fig. 1. Interactions of human serum albumin with myristic acid: *a* – tertiary structure of the complex of albumin, myristic acid and thyroxine; *b* – interposition of the molecules of myristic acid and thyroxine; *c* – tertiary structure of the complex of albumin with myristic acid; *d* – interposition of the molecules of myristic acid

В плазме крови находится более 60 различных жирных кислот, но наиболее распространенными являются пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая [12]. Одна молекула альбумина способна переносить до 8 молекул тетрадекановой кислоты (1E7G), до 10 молекул декановой кислоты (1E7E), до 8 молекул додекановой кислоты (1E7F), до 7 молекул гексадекановой кислоты (1E7H), до 7 молекул октадекановой кислоты (1E7I), до 7 молекул *цис*-9-октадеценной кислоты (1GNI),

Таблица 2. Номера аминокислотных остатков сывороточного альбумина человека, которые формируют взаимодействия различной природы с жирными кислотами

Table 2. Numbers of amino acid residues of human serum albumin forming different types of interactions with fatty acids

Номер жирной кислоты из файлов PDB Fatty acid number from the PDB files	Наименование жирной кислоты Name of fatty acid						cis-5,8,11,14-эйкозагетраеновая cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic
	Декановая Decanoic	Додекановая Dodecanoic	Тетрадекановая Tetradecanoic	Гексадекановая Hexadecanoic	Октадекановая Octadecanoic	cis-9-октадеценная cis-9-octadecenoic	
1	Leu135, Tyr138, Tyr161; <u>Arg117</u>	Tyr138, Ala158, Tyr161, Phe165; <u>Arg117</u>	Arg117, Tyr138, Tyr161, Phe165; <u>Arg117</u>	Arg117, Leu135, Tyr138, Leu139, Ala158, Tyr161; <u>Arg117</u>	Leu115, Arg117, Tyr138, Leu139, Ile142, Ala158, Tyr161, Phe165; <u>Tyr161; Arg117</u>	Tyr138, Phe149, Ala158, Tyr161; <u>Arg117, Arg186</u>	Tyr138, Ile142, Leu154, Phe157, Tyr161; <u>Tyr161; Arg117, Arg186</u>
2	Leu284; <u>Tyr150, Ser287; Arg257</u>	Leu14, Phe19, Val23, Pro152, Leu251, Ala254, Leu284; <u>Tyr150, Leu283, Ser287; Arg257</u>	Phe19, Val23, Leu66, Pro152, Ala254, Leu283; <u>Tyr150, Ser287; Arg257</u>	Val23, Val46, Leu66, Leu69, Leu251, Ala254; <u>Tyr150, Leu283, Ser287; Arg257</u>	Val46, Leu69, Phe70, Ala254, Leu283; <u>Tyr150, Ser287; Arg257</u>	Val23, Val46, Leu69, Pro152, Leu251, Ala254; <u>Tyr150, Ser287; Arg257</u>	Leu14, Leu22, Val46, Leu66, Leu69, Phe70, Leu251, Ala254, Leu283; <u>Tyr150, Ser287; Arg257</u>
3	Ile388, Ala449, Leu453; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Pro384, Val433, Leu453; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Leu387, Ile388; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Leu387, Ile388, Val433; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Pro384, Leu387, Ile388, Glu450; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Leu387, Ile388, Ala449, Leu453; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>	Val344, Pro384, Leu387, Ile388, Leu430, Ala449, Glu450; <u>Ser342; Arg348, Arg485</u>
4	Tyr411, Val415, Leu423, Val426, Leu430, Leu457, Leu460, Phe488; <u>Tyr411; Arg410</u>	Tyr411, Val415, Val418, Val426, Leu430, Leu457, Leu460, Phe488; <u>Tyr411; Arg410</u>	Val415, Leu457, Leu460; <u>Tyr411; Arg410</u>	Tyr411, Val418, Leu430, Leu457, Leu460, Leu463, His464, Phe488; <u>Tyr411; Arg410, Lys414</u>	Tyr411, Val415, Val418, Leu457, Leu460, Leu463, His464, Phe488; <u>Tyr411, Ser489</u>	Tyr411, Thr422, Leu457, Leu463; <u>Tyr411; Arg410, Lys414</u>	Tyr411, Val415, Val418, Leu430, Leu457, Leu460, Leu463, His464, His464, Phe488; <u>Tyr411, Ser489</u>
5	Phe507, Lys525, Leu532; <u>Tyr401; Lys402, Lys525</u>	Phe507, Leu532, Val547, Phe551; <u>Tyr401; Lys525</u>	Phe502, Leu532, Phe551; <u>Tyr401; Lys525</u>	Phe502, Phe507, Ala528, Phe551, Gln580; <u>Tyr401; Lys525</u>	Phe507, Lys525, Ala528, Leu532, Lys536, Phe551, Gln580; <u>Tyr401; Lys525</u>	Ala528, Lys536, Val547, Met548, Phe551, Leu575, Val576, Leu583; <u>Tyr401; Lys525</u>	Tyr401, Phe507, Lys525, Ala528, Leu532, Phe551, Gln580; <u>Tyr401; Lys525</u>

6	Ala213	Ala213	Ala210, Lys212, Ala213, Leu327	Ala210, Ala213, Val216, Phe228, Leu327, Ala350	Ala210, Leu327, Ala350; <u>Ser480</u>	Ala210, Ala213, Leu327, Ala350; <u>Ser480</u>	Arg209, Ala213, Val216, Asp324, Leu327, Lys351; <u>Arg209</u>
7	Leu219, Leu260, Ile290, Ala291	Ala213 Leu219, Leu238	Trp214, Arg218, Leu219, Leu238, Ile290	Arg218, Leu219, Leu260, Ile264	Arg218, Arg257	Arg218, Leu219, Leu260, Ile290	Leu260, Ile264, Ile290, Ala291
8	Lys190, Ala194, Gln459; <u>Asn429; Lys432, Lys436</u>	Val46, Phe49, Leu66, Leu69, Phe70, Lys73, Leu251	Val46, Phe49, Leu66, Leu69, Leu251				Leu463; <u>Thr422</u>
9	Leu198, Lys199, Ala210, Trp214, Leu481, Val482; <u>Ser454</u>						
10	Ala213, Leu327						

Примечания: обычным шрифтом обозначены аминокислотные остатки, формирующие гидрофобные взаимодействия с жирными кислотами, подчеркнутым – водородные связи, а курсивом – образующие солевые мостики.

Notes: the usual font indicates amino acid residues forming hydrophobic interactions with fatty acids, underlined font – hydrogen bonds, and italic font – forming salt bridges.

до 8 молекул *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновой кислоты (1GNJ). С помощью алгоритма PLIP мы определили взаимодействия между каждой молекулой жирной кислоты и альбумином. Оказалось, что независимо от длины углеродного радикала одна из молекул (первая) находится в гидрофобном кармане и формирует взаимодействия различной природы с аминокислотными остатками, которые участвуют в связывании билирубина. Каждая жирная кислота связана гидрофобным взаимодействием с Tyr138 и Tyr161, солевым мостиком с Arg117. Октадекановая кислота также формирует гидрофобное взаимодействие с Leu115. Октадекановая и *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислоты гидрофобно связаны с Ile142, *цис*-9-октадеценная кислота – с Phe149, а *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота еще и с Phe157. Второй солевой мостик с Arg186 формируют только *цис*-9-октадеценная и *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислоты. Водородные связи с Tyr161 формируют только октадекановая и *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислоты (табл. 2).

Гем и гемин, также как и жирные кислоты, имеют сайт связывания в той же области альбумина, что и билирубин. На рис. 2 показаны структуры билирубина (PDB ID: 2VUE; рис. 2, *a*), гема (PDB ID: 1N5U; рис. 2, *b*), миристиновой кислоты (PDB ID: 1BJ5; рис. 2, *c*) в одном и том же сайте связывания. Установлено, что гем взаимодействует с Phe134, Tyr138, Leu139, Ile142, Phe149, Phe157, Ala158, Tyr161, Phe165, Arg186, Lys190 (гидрофобные контакты); с Gly189, Ser193 (водородные связи); с Tyr161 (π -взаимодействие), с Arg114, His146, Lys190 (солевые мостики), т. е. в связывании гема участвуют те же аминокислотные остатки, что и в связывании билирубина. Энергия взаимодействия гема с альбумином составляет $-6,81$ ккал/моль, а константа ингибирования $10,13$ мкмоль/л.

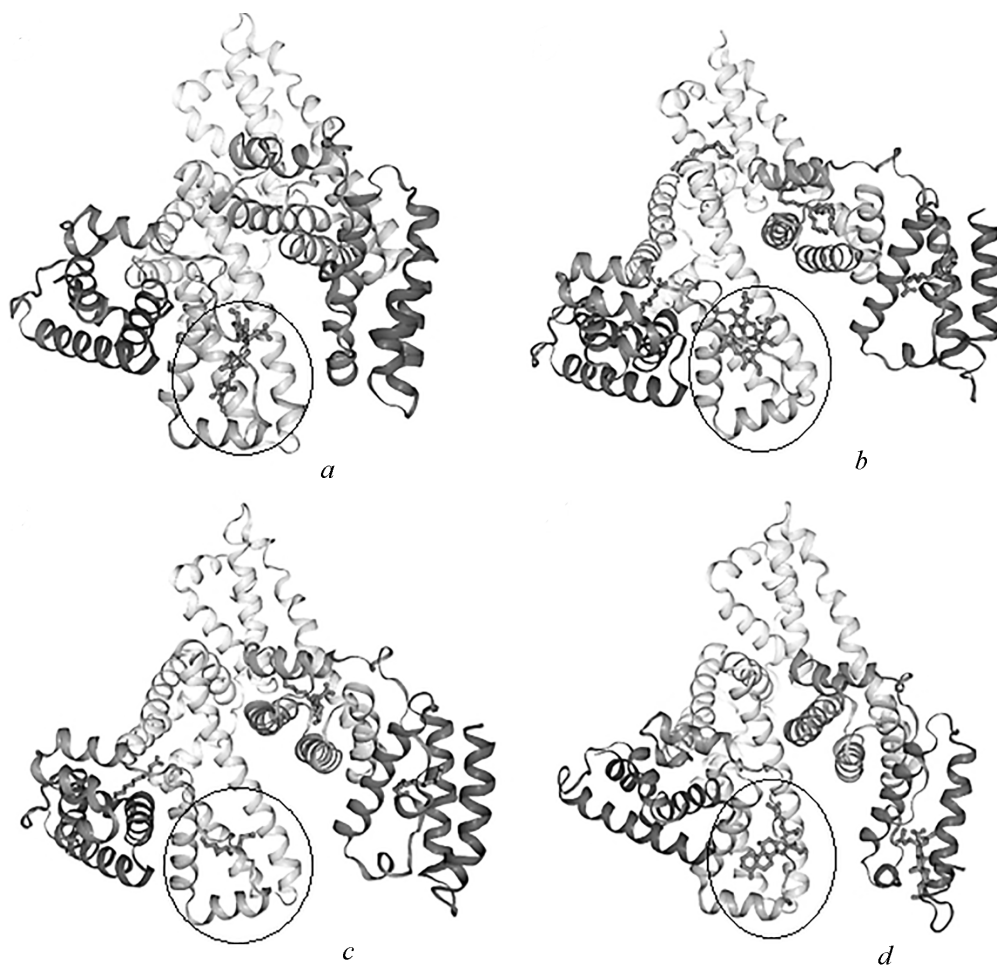


Рис. 2. Взаимодействия сывороточного альбумина человека с билирубином (*a*), гемом (*b*), миристиновой кислотой (*c*), фузидовой кислотой (*d*)

Fig. 2. Interactions of human serum albumin with bilirubin (*a*), heme (*b*), myristic acid (*c*), fusic acid (*d*)

Так как жирные кислоты и гем способны связываться с теми же аминокислотными остатками из сайта связывания в первом домене сывороточного альбумина человека, который известен как сайт связывания билирубина, напрашивается логичный вопрос: способны ли данные лиганды вытеснить билирубин из сайта связывания?

Для ответа на этот вопрос мы, используя константу ингибирования, рассчитали константу равновесия образования комплексов альбумина с различными лигандами: $K_p = 1 / K_i$. Следующим этапом стал расчет концентрации комплекса альбумина с каждым из лигандов:

$$K_p = [X] / (([\text{альбумина}] - [x])([\text{лиганда}] - [x])),$$

где $[X]$ – концентрация комплекса альбумин–лиганд; $[x]$ – концентрация альбумина, связавшего лиганд, и концентрация связавшегося лиганда с учетом того, что одна молекула альбумина связывает одну молекулу лиганда.

Рассчитанная по аминокислотной последовательности молярная масса сывороточного альбумина человека с помощью Protein calculator v3.4 (<http://protcalc.sourceforge.net/>) составляет 66472 г/моль. Для расчетов молярной концентрации мы взяли средние значения массовых концентраций для взрослых и детей с одного года до 16 лет – 42,5 г/л, а для детей первого года жизни – 37,5 г/л. Молярные концентрации сывороточного альбумина составили соответственно – 0,000639 и 0,000564 моль/л, что согласуется с данными [2]. Концентрация общего билирубина в норме от 5 до 17 мкмоль/л [2]. Молярная масса билирубина-IX альфа – 583 г/моль, т. е. верхняя граница нормы молярной концентрации билирубина-IX альфа как для детей первого года жизни, так и взрослых составляет 0,00020583 моль/л. Если константа ингибирования комплекса альбумин–билирубин составляет 417,38 мкмоль/л, тогда константа равновесия – 2395,898. Такое большое значение константы равновесия говорит о том, что равновесная молярная концентрация комплекса билирубина с альбумином намного выше, чем равновесные молярные концентрации альбумина и билирубина.

Решив квадратные уравнения ($2395,898x^2 - 2,5803x + 0,0000315 = 0$ и $2395,898x^2 - 2,4006x + 0,0000278 = 0$), мы нашли максимальную молярную концентрацию комплекса альбумин–билирубин. Для взрослых она составляет – 12,35 мкмоль/л, а для детей первого года жизни – 11,72 мкмоль/л.

Точно такой же подход мы применили и к расчету концентрации комплексов альбумина с жирной кислотой и альбумина с тироксином. Молярная концентрация тироксина в норме в сыворотке крови находится в диапазоне от 50 до 140 нмоль/л. Решив квадратное уравнение $109,051x^2 - 1,0697x + 0,000000066 = 0$, мы нашли максимальную молярную концентрацию комплекса альбумин–тироксин ($x = 6,17$ нмоль/л). Таким образом, учитывая значения энергии связывания альбумина с тироксином, константы ингибирования, можно утверждать, что тироксин способен вытеснить билирубин из сайта связывания первого домена, но, сравнив концентрации комплексов альбумина с билирубином и альбумина с тироксином, становится очевидным, что при физиологических значениях концентрации тироксина лишь небольшая часть его молекул способна вытеснить билирубин из сайта связывания первого домена. Также необходимо учитывать, что альбумин не является основным белком, переносящим тироксин. Транспорт тироксина в сыворотке крови осуществляется также транстиретином и тироксинсвязывающим глобулином.

Содержание в крови жирных кислот сильно варьирует: пальмитиновая кислота – 0,3–4,1 ммоль/л, стеариновая – 0,1–1,0 ммоль/л, олеиновая – 0,03–3,2 ммоль/л, линолевая – 0,2–5,0 ммоль/л, линоленовая – 12,0–186,9 мкмоль/л [12]. Для расчетов взяли среднее значение для линолевой кислоты – 2,6 ммоль/л и получили следующее квадратное уравнение: $8475,294x^2 - 27,816x + 0,0124 = 0$. При этом можно взять любую другую жирную кислоту, так как каждая из них способна связываться с гидрофобным карманом в первом домене альбумина. Решив полученное квадратное уравнение, мы получили концентрацию комплекса альбумина с жирной кислотой – 530 мкмоль/л, что значительно превышает концентрацию комплекса альбумина с билирубином, однако, если учесть, что одна молекула альбумина, в основном, связывает 7 молекул жирных кислот, тогда концентрация комплекса альбумина с жирной кислотой составит 265 мкмоль/л, что все равно намного выше концентрации комплекса альбумина с билирубином. Таким образом, можно предположить, что связывание жирных кислот с альбумином вызывает его конформационную перестройку, приводящую к появлению сайтов связывания билирубина, гораздо более специфичных, чем описанный сайт в первом домене.

Каждая молекула гемоглобина содержит четыре гема, по одному для каждой из его цепей. Один или несколько (менее вероятно) гемоглобиновых гемов могут высвобождаться. Концентрация гема в эритроцитах составляет 21 ± 2 мкмоль/л [13]. В сыворотку крови гем может попасть в значительных количествах лишь при патологических состояниях (массивном внутрисосудистом гемолизе, геморрагическом шоке, гемолитических анемиях, переливании несовместимой крови). В гемине, так же как и в гематине, катион железа находится в степени окисления +3, однако гемин представляет собой окисленную форму гема, содержащую хлорид ион. Оба вещества, гемин и гематин, являются токсичными, вызывая лизис эритроцитов человека и других типов клеток, поэтому существует несколько способов их нейтрализации [14]. Наиболее эффективным геминсвязывающим белком является гемопексин ($K_d < 10^{-13}$ М) [15]. Липопротеины ЛПНП/ЛПВП, а также альбумин способны связывать гемин (K_d от 10^{-10} М до 10^{-11} М и 10^{-8} М соответственно) [15]. Если рассчитать энергию взаимодействия гемина и альбумина, используя вышеприведенную константу, то она составит $-11,35$ ккал/моль, т. е. ниже, чем рассчитанная докинг-сервером, что наводит на мысль о наличии нескольких сайтов связывания гемина в сывороточном альбумине человека. Таким образом, концентрация гемина, способного связаться с сайтом связывания в первом домене, будет очень низкой, а следовательно, и концентрация комплекса альбумина с геминем в первом домене будет ничтожно мала, что, однако, не противоречит тому, что при равной концентрации гемин способен вытеснять билирубин из гидрофобного кармана в первом домене.

Чтобы доказать возможность использования модели 4K2C и значимость полученных результатов после проведения докинга эндогенных лигандов к структуре нативного альбумина (PDB ID: 4K2C), мы также провели докинг тех же веществ и к структуре 2VUE. В качестве связывателей Molecular Docking server выбрал автоматически тот же «карман», в котором находился билирубин. Как и ожидалось, константа ингибирования комплекса пальмитиновой кислоты и альбумина и энергия связывания составили 164,28 мкмоль/л и $-5,16$ ккал/моль. Эти же значения для структуры альбумина 4K2C составляют 117,99 мкмоль/л и $-5,36$ ккал/моль. Константа ингибирования комплекса тироксина и структуры альбумина 2VUE и энергия связывания равны 9,83 мкмоль/л и $-6,83$ ккал/моль. Эти же значения для структуры альбумина 2VUE и тироксина составляют 9,17 мкмоль/л и $-6,87$ ккал/моль. Очень схожие значения констант ингибирования и энергии связывания эндогенных лигандов и двух структур сывороточного альбумина подтверждают идентичность структур альбумина. Действительно, третичные структуры 2VUE и 4K2C схожи между собой на 98,3 %. Небольшое отличие можно объяснить областью с отсутствующей электронной плотностью (аминокислотные остатки 79–88) на структуре 2VUE.

Вытеснять билирубин из сайтов связывания, приводя к увеличению его концентрации в плазме крови, могут не только эндогенные, но и экзогенные вещества. Таким свойством, например, обладает фузидовая кислота, применяемая в качестве антибиотика, в связи с чем имеются ограничения к применению данного препарата у новорожденных, особенно недоношенных, и у лиц с нарушением функции печени. Действительно, молекула данного вещества располагается в том же сайте связывания, что и билирубин (рис. 2, d).

Таким образом, эндогенные лиганды (жирные кислоты, тироксин, гем) способны вытеснять билирубин из сайта связывания в первом домене сывороточного альбумина человека. При этом клинические проявления возникают лишь у небольшого процента, что подтверждает факт существования нескольких сайтов связывания для билирубина. Более низкие значения энергий связывания эндогенных лигандов с аминокислотными остатками из сайта связывания первого домена указывают на то, что данный сайт связывания не является основным для билирубина *in vivo*. Формирование же специфичного сайта связывания для физиологического изомера билирубина возможно в результате конформационной перестройки после связывания жирных кислот, подобно тому, как это происходит с тироксином и молекулами миристиновой кислоты.

Заключение. Тироксин, жирные кислоты, гем способны вытеснять билирубин из сайта связывания первого домена сывороточного альбумина человека. Связывание жирных кислот с сывороточным альбумином человека должно приводить к конформационной перестройке сывороточного альбумина человека и формированию более специфичных сайтов связывания для билирубина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. He, X. M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / X. M. He, D. C. Carter // *Nature*. – 1992. – Vol. 358. – P. 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>
2. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX α / P. A. Zunszain, J. Ghuman, A. F. McDonagh, S. Curry // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 381, N 2. – P. 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016>
3. Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia / I. Petitpas, Ch. E. Petersen, Ch.-E. Ha [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100, N 11. – P. 6440–6445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1137188100>
4. Bhattacharya, A. A. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin / A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 303, N 5. – P. 721–732. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158>
5. Желтухи неонатального периода / А. К. Ткаченко, А. А. Устинович, О. Н. Романова [и др.]. – Мн., 2017. – 68 с.
6. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites / S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 5. – P. 827–835. <https://doi.org/10.1038/1869>
7. Colmenarejo, G. *In silico* prediction of drug-binding strengths to human serum albumin / G. Colmenarejo // *Medicinal Research Reviews*. – 2003. – Vol. 23, N 3. – P. 275–301. <https://doi.org/10.1002/med.10039>
8. Chung, E. H. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants: a recent literature review / E. H. Chung, J. Chou, K. A. Brown // *Translational Pediatrics*. – 2020. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 3–8. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.10>
9. Сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека: возможность влияния на них мутаций, вызванных радиацией / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталева, А. Н. Стожаров, Т. А. Хрусталева // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук*. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 46–57. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57>
10. The structural characterization and bilirubin-binding properties of albumin Herborn, a [Lys240→Glu] albumin mutant / L. Minchiotti, M. Galliano, M. C. Zapponi, R. Tenni // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – Vol. 214, N 2. – P. 437–444. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17939.x>
11. Jacobsen, J. Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength / J. Jacobsen // *International Journal of Peptide and Protein Research*. – 1977. – Vol. 9, N 3. – P. 235–240. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1977.tb03486.x>
12. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults / S. A. Abdelmagid, Sh. E. Clarke, D. E. Nielsen [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, N 2. – Art. e0116195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>
13. Aich, A. The free heme concentration in healthy human erythrocytes / A. Aich, M. Freundlich, P. Vekilov // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2015. – Vol. 55, N 4. – P. 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.09.003>
14. Hematin- and hemin-induced spherization and hemolysis of human erythrocytes are independent of extracellular calcium concentration / D. M. Mikhailova, E. Skverchinskaya, Ju. Sudnitsyna [et al.] // *Cells*. – 2024. – Vol. 13, N 6. – Art. 554. <https://doi.org/10.3390/cells13060554>
15. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins / D. J. Schaer, P. W. Buehler, A. I. Alayash [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, N 8. – P. 1276–1284. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>

References

1. He X. M., Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, pp. 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>
2. Zunszain P. A., Ghuman J., McDonagh A. F., Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX α . *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 381, no. 2, pp. 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016>
3. Petitpas I., Petersen C. E., Ha C.-E., Bhattacharya A. A., Zunszain P. A., Ghuman J., Bhagavan N. V., Curry S. Structural basis of albumin–thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no. 11, pp. 6440–6445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1137188100>
4. Bhattacharya A. A., Grüne T., Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 2000, vol. 303, no. 5, pp. 721–732. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158>
5. Ткаченко А. К., Устинович А. А., Романова О. Н., Клущарова А. А., Новак Л. В. *Neonatal Jaundice*. Minsk, 2017. 68 p. (in Russian).
6. Curry S., Mandelkow H., Brick P., Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1998, vol. 5, pp. 827–835. <https://doi.org/10.1038/1869>
7. Colmenarejo G. *In silico* prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Medicinal Research Reviews*, 2003, vol. 23, no. 3, pp. 275–301. <https://doi.org/10.1002/med.10039>

8. Chung H. E., Chou J., Brown K. A. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants: a recent literature review. *Translational Pediatrics*, 2020, vol. 9, suppl. 1, pp. 3–8. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.10>
9. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stojarov A. N., Khrustaleva T. A. Influence of mutations caused by radiation exposure on the bilirubin binding sites of human serum albumin. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 46–57 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57>
10. Minchiotti L., Galliano M., Zapponi M. C., Tenni R. The structural characterization and bilirubin-binding properties of albumin Herborn, a [Lys240→Glu] albumin mutant. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 214, no. 2, pp. 437–444. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17939.x>
11. Jacobsen J. Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1977, vol. 9, no. 3, pp. 235–240. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1977.tb03486.x>
12. Abdelmagid S. A., Clarke S. E., Nielsen D. E., Badawi A., El-Sohemy A., Mutch D. M., Ma D. W. L. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 2, art. e0116195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>
13. Aich A., Freundlich M., Vekilov P. G. The free heme concentration in healthy human erythrocytes. *Blood cells, Molecules, and Diseases*, 2015, vol. 55, no. 4, pp. 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.09.003>
14. Mikhailova D. M., Skverchinskaya E., Sudnitsyna J., Butov K. R., Koltsova E. M., Mindukshev I. V., Gambaryan S. Hematin- and hemin-induced spherization and hemolysis of human erythrocytes are independent of extracellular calcium concentration. *Cells*, 2024, vol. 13, no. 6, art. 554. <https://doi.org/10.3390/cells13060554>
15. Schaer D. J., Buehler P. W., Alayash A. I., Belcher J. D., Vercellotti G. M. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 8, pp. 1276–1284. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>

Информация об авторах

Побойнев Виктор Витольдович – канд. биол. наук, доцент, заместитель декана. E-mail: dremozzew@mail.ru.

Стожаров Александр Николаевич – д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры. E-mail: stojarov@mail.ru.

Information about the authors

Poboinev Victor V. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Deputy Dean. E-mail: dremozzew@mail.ru.

Stojarov Aleksander N. – D. Sc. (Biology), Professor, Professor of the Department. E-mail: stojarov@mail.ru.