

Лазовская О. И., Поротова А. Р., Пархутик А. А.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИЛИРУБИНА С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

Научный руководитель канд. хим. наук, доц. Леонтьев В. Н.

Кафедра биотехнологии

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск

Актуальность. Сывороточный альбумин человека (САЧ) является основным белком плазмы крови. Уникальная способность САЧ к обратимому связыванию низкомолекулярных веществ определяет одну из наиболее важных его функций – транспорт различных соединений к органам и тканям. Среди лекарственных препаратов и эндогенных метаболитов наибольшим сродством к САЧ обладает билирубин (константа связывания $K_b = 9,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), представляющий собой тетрапиррольное соединение, которое образуется при распаде гема в печени. Физиологическое значение связывания билирубина с САЧ обусловлено его низкой растворимостью в водных средах в результате образования внутримолекулярных водородных связей и токсичностью в свободном состоянии. Известно, что взаимодействие низкомолекулярных соединений с САЧ приводит к изменению пространственной структуры белковой молекулы. При этом наиболее информативными и чувствительными методами для изучения таких взаимодействий являются производная спектрофотометрия и флуоресцентная спектроскопия.

Цель: анализ взаимодействия билирубина с САЧ спектральными методами.

Материалы и методы. В работе использовали билирубин (Carl Roth, Германия), диметилсульфоксид (Димексид-Белмед, РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь) и САЧ. В качестве САЧ выбрали ЛП «Альбуфарм, раствор для инфузий 200 мг/мл» (СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь), поскольку содержание в нем связанного билирубина на порядок меньше, чем в коммерческих препаратах САЧ. Раствор билирубина готовили в диметилсульфоксиде. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord 200 Plus (Analytik Jena, Германия) в диапазоне длин волн 425–575 нм. Первые производные спектров поглощения получали с помощью программного обеспечения WinAspect Plus спектрофотометра. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре FP-8500 (Jasco, Япония) в диапазоне длин волн 480–600 нм при $\lambda_{\text{возб}} = 460 \text{ нм}$ (ширина щелей 5,0 нм).

Результаты и их обсуждение. Показано, что в электронных спектрах САЧ полоса поглощения связанного билирубина является скрытой. В связи с этим для ее обнаружения использовали производную спектрофотометрию. Титрование САЧ раствором билирубина позволило выявить в первых производных спектров поглощения изобестическую точку при длине волны 460 нм, соответствующую максимуму поглощения билирубина в спектрах нулевого порядка, и получить линейную зависимость величины $|dA/d\lambda|$ в минимуме полосы поглощения от концентрации билирубина. Наличие полосы испускания с максимумом при длине волны 520 нм в спектре флуоресценции свидетельствует о присутствии связанного билирубина в САЧ. При титровании разбавленного раствора САЧ наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции, обусловленное исключительно возрастанием концентрации добавленного билирубина, а не связанного с альбумином, так как установлено, что кинетика связывания билирубина с САЧ очень медленная.

Выводы. Исследования показали, что применение производной спектрофотометрии не позволяет наблюдать процесс связывания билирубина с САЧ, поскольку положение минимума полосы и величина $|dA/d\lambda|$ в спектрах поглощения первого порядка не изменяются с течением времени. В то время как флуоресцентная спектроскопия дает возможность различать свободный и связанный билирубин, поскольку квантовый выход флуоресценции билирубина существенно зависит от его микроокружения. Десятикратное увеличение квантового выхода флуоресценции связанного билирубина по сравнению со свободным билирубином обусловлено переносом энергии возбужденного состояния с остатка триптофана в аминокислотной последовательности САЧ на билирубин.