

ПРОБЛЕМЫ СОЛЬВАТАЦИИ  
И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ В РАСТВОРАХ

УДК 544.34+544.17

РАВНОВЕСИЯ В СИСТЕМЕ БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ  
АЛЬБУМИН–ПИРИДОКСАЛЬ-5-ФОСФАТ  
4-ГИДРОКСИБЕНЗОИЛГИДРАЗОН–ИОН  $\text{La}^{3+}$  <sup>1</sup>

© 2022 г. Д. Н. Яруллин<sup>а</sup>, М. Н. Завалишин<sup>а</sup>, В. А. Шарнин<sup>а</sup>, Г. А. Гамов<sup>а,\*</sup>

<sup>а</sup>Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

\*e-mail: ggamov@isuct.ru

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 08.11.2021 г.

Принята к публикации 10.11.2021 г.

В настоящей работе спектрофлуориметрическим методом исследовано взаимодействие в растворе между гидразоном, образованным пиридоксаль-5-фосфатом и гидразидом 4-гидроксибензойной кислоты, с бычьим сывороточным альбумином. Двумя методами рассчитана константа связывания гидразона с белком, обсуждаются особенности расчетных методов. Спектрофотометрически изучен раствор, в котором присутствуют гидразон, ионы  $\text{La}^{3+}$  и бычий сывороточный альбумин. Показано, что увеличение концентрации белка приводит к постепенному разрушению комплекса лантан(III)-гидразон за счет связывания лиганда с белком.

*Ключевые слова:* пиридоксаль-5-фосфат, гидразон, бычий сывороточный альбумин, константа равновесия

**DOI:** 10.31857/S0044453722060322

Пиридоксаль (PL) и пиридоксаль-5-фосфат (PLP) – формы витамина  $\text{B}_6$ , коферменты, принимающие участие в большом количестве разнообразных биохимических реакций, включая трансаминирование, дезаминирование и рацемизацию аминокислот [1]. PLP-зависимые ферменты также важны для биосинтеза жирных кислот, нейротрансмиттеров и связывания активных форм кислорода [2, 3]. Пониженный уровень форм витамина  $\text{B}_6$  может быть связан с различными патологическими состояниями, поэтому концентрация пиридоксаля и пиридоксаль-5-фосфата в плазме важна с диагностической точки зрения [4].

Благодаря наличию альдегидной группы в составе молекулы, PL и PLP способны достаточно легко вступать в реакцию сочетания с гидразидами, образуя гидразоны. Они, в свою очередь, также обладают высокой биологической активностью, преимущественно вследствие способности связывать такие жизненно важные ионы  $d$ -элементов как  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  в устойчивые хелатные комплексы. Так, например, ряд гидразонов пиридоксаля подавляет ангиогенез в опухолях за счет комплексообразования с ионами железа [5, 6]. Комплексы меди(II) с гидразонами, образо-

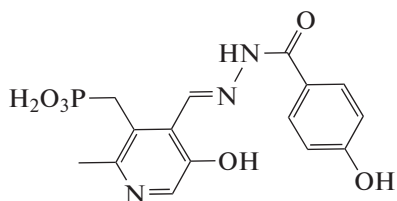
ванными пиридоксалем и гидразидами с фенольной группой, способны имитировать активность фермента супероксиддисмутазы, играющего важную роль в защите организма от образующихся кислородных радикалов [7].

Учитывая потенциальную биологическую значимость как свободных гидразонов, так и их комплексов с различными металлами, важным становится исследование взаимодействия этих соединений с белками [8]. В настоящей работе мы изучили связывание с бычьим сывороточным альбумином (БСА) гидразона, образованного пиридоксаль-5-фосфатом и гидразидом 4-гидроксибензойной кислоты, аналог которого (с пиридоксалем) показал высокую антиоксидантную активность [7]. Кроме того, проанализировали взаимодействие в системе, содержащей белок, гидразон и ионы лантана(III), учитывая, что комплексообразование  $\text{La}^{3+}$  с этим соединением PLP уже было изучено [9].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Процедура синтеза гидразона PLP и гидразида 4-гидроксибензойной кислоты (в дальнейшем **PLP-4ОН**, рис. 1) описана в [9]. Бычий сывороточный альбумин (Sigma Aldrich, США) и  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Редкийметалл.рф, Россия) использовались

<sup>1</sup> XIV Международная научная конференция, Иваново, 20–24 сентября 2021 г.



**Рис. 1.** Формула гидразона, образованного пиридоксаль-5-фосфатом и гидразидом 4-гидроксибензойной кислоты.

без предварительной очистки. Заявленная производителем чистота белка составляла >98%, а соли лантанида – 99.2%.

Растворы готовились на бидистиллированной воде ( $\kappa = 3.6$  мкСм/см, pH 6.6). Использовались два буферных раствора с pH 7.4: фосфатный, приготовленный из  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Реахим, Россия), и ТРИС-НСI, приготовленный из трис(гидроксиметил)аминометана (Sigma, США) и стандартизованной соляной кислоты. Стоковый раствор белка в фосфатном или ТРИС-НСI буфере хранился в темном месте при 4°C, причем, концентрация БСА определялась каждый раз перед основными экспериментами спектрофотометрически с использованием литературного значения молярного коэффициента светопоглощения  $\epsilon_{280} = 43824$  [10].

Взаимодействие гидразона **PLP-4OH** с БСА исследовали на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Белоруссия), возбуждая флуоресценцию белка при 270 нм и измеряя испускание при 280–400 нм. Ширина оптической щели возбуждения составляла 2 нм, испускания – 5 нм. Использовались стандартные кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см. Раствор БСА в фосфатном буфере (pH 7.4) концентрацией  $1.18 \times 10^{-5}$  либо  $5.52 \times 10^{-6}$  моль/л и объемом 2.5 мл титровали 10 добавками буферного раствора гидразона концентрацией 0.0005–0.0006 моль/л. Объем каждой добавки составлял 10 мкл.

В соответствии с рекомендациями [11, 12] проводилась корректировка результатов спектрофлуориметрического титрования на эффект внутреннего фильтра по уравнению:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{0.5(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})}. \quad (1)$$

Константы связывания гидразона с белком рассчитывались при помощи программного обеспечения KEV [13], а также недавно предложенного Е.А. Ширшиным с соавторами способа [14].

Взаимодействие БСА с комплексом  $\text{La}^{3+}$  с **PLP-4OH** в буферном растворе ТРИС-НСI (фосфатный буфер в системах, содержащих ионы лан-

танидов(III), неприменим из-за образования малорастворимых фосфатов  $\text{Ln}^{3+}$ ) исследовали спектрофотометрически на приборе Shimadzu UV1800 (США) в диапазоне длин волн 200–500 нм и оптической плотности 0–2 ед. Использовались стандартные кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см. Раствор объемом 2.7 мл, содержащий гидразон концентрацией  $0.8 \times 10^{-5}$ – $1.0 \times 10^{-4}$  моль/л и  $\text{La}^{3+}$  концентрацией  $5.3 \times 10^{-5}$ – $5.6 \times 10^{-4}$  моль/л, титровали 10 добавками раствора БСА концентрацией 0.0020–0.0021 моль/л. Объем каждой добавки составлял 20 мкл. Результаты эксперимента обрабатывались при помощи программного обеспечения KEV [13].

Известно, что ТРИС, обладающий аминогруппой, способен образовывать основание Шиффа с PLP [15], а реакции образования гидразонов PLP обратимы [16–18]. Следовательно, при длительном пребывании гидразона в буферном растворе с относительно высокой концентрацией ТРИС, равновесие смещается в сторону образования имина PLP-ТРИС. По этой причине растворы использовались в течение получаса после приготовления.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Скорректированные спектры флуоресценции БСА концентрацией  $1.18 \times 10^{-5}$  и  $5.52 \times 10^{-6}$  моль/л в присутствии возрастающего количества гидразона **PLP-4OH** приведены на рис 2а, б.

Анализ уменьшения интенсивности флуоресценции БСА при помощи уравнения Штерна–Фольмера [11, 12]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q], \quad (2)$$

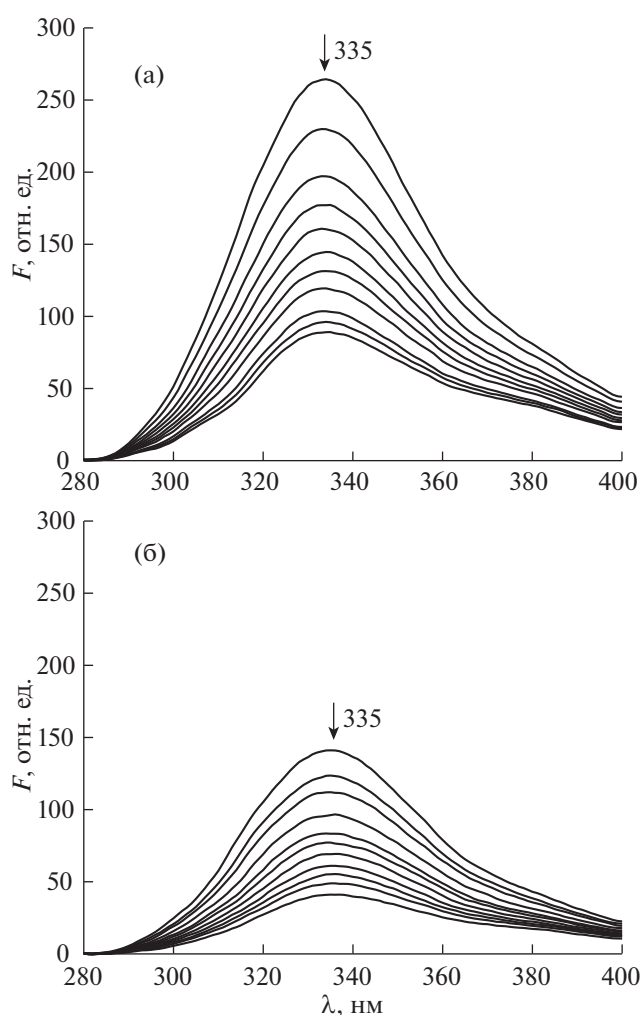
(где  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно;  $k_q$  – бимолекулярная константа скорости тушения;  $\tau_0$  – время затухания флуоресценции в отсутствие тушителя;  $[Q]$  – концентрация тушителя) дает величину  $k_q$  порядка  $10^{13}$  с учетом времени затухания флуоресценции  $\tau_0 = 10$  нс [11]. Это значительно выше, чем  $2 \times 10^{10}$ , указанное как предельное значение для динамического тушения [11], следовательно, можно предположить связывание малой молекулы с белком.

Константу связывания гидразона **PLP-4OH** с БСА рассчитывали двумя способами. Во-первых, расчет проводился при помощи программного обеспечения KEV [13], отыскивающего минимум суммы квадратов разностей между экспериментальными результатами и рассчитанными при разных значениях оптимизируемых параметров. Кроме того, мы использовали метод, предложенный авторами [14] и разработанное ими же про-

граммное обеспечение [19]. Суть идеи [14] заключается в модификации уравнения Штерна–Фольмера таким образом, что член  $F_0/F$  зависит от общей концентрации флуорофора и тушителя, без применения необоснованных допущений о равенстве общей и равновесной концентраций тушителя, а также о всегда нулевом относительном квантовом выходе продукта взаимодействия. При этом, для того, чтобы воспользоваться уравнением [14] и программным обеспечением [19], необходимо получить как минимум две серии экспериментальных данных, в которых бы различались общие концентрации флуорофора. Несмотря на то, что KEV позволяет выполнить надежный расчет всего по одной экспериментальной серии, мы не считаем, что более трудозатратный способ [14] хуже применим при исследовании равновесий “малая молекула–белок”. Для того, чтобы удостовериться в надежности результатов, вычисляемых при помощи подхода максимального правдоподобия [13], имеет смысл повторение опытов в разных концентрационных условиях. Величины оптимизируемых параметров при этом должны возвращаться одни и те же.

Более важной проблемой может оказаться выбор концентраций флуорофора таким образом, чтобы оставаться в концентрационном диапазоне, в котором, с одной стороны, не превышены пределы выполнения аддитивного закона для измеряемой величины, а с другой, флуорофора все еще достаточно для надежного измерения экспериментальных данных. Например, при снижении концентрации БСА с 11.8 мкмоль/л, использованной в первой серии (рис. 2а) до 1.18 мкмоль/л в начале титрования интенсивность флуоресценции составляла бы всего лишь порядка 25–27 единиц, дополнительно убывая в дальнейшем с ходом титрования.

Однако, метод [14] вполне надежно может быть применен и при всего лишь двукратной разнице в общей концентрации белка в двух разных сериях, получившейся в нашем эксперименте. Так, по данным рис. 2а KEV возвращает величину константы  $\lg \beta = 5.12 \pm 0.11$  с величиной  $F_{\text{продукт}}/F_{\text{белок}} = 0.43\%$ , по данным рис. 2б —  $\lg \beta = 5.13 \pm 0.03$  с величиной  $F_{\text{продукт}}/F_{\text{белок}} = 0.38\%$ , а расчет в программе [19] дает  $\lg \beta = 5.11$  и  $F_{\text{продукт}}/F_{\text{белок}} = 0.30\%$  (рис. 3). При этом, метод [14] дает информацию, что у белка единственный сайт связывания. Расчеты в KEV, при которых тестировались стехиометрические модели с коэффициентом перед гидразоном больше единицы, а также две параллельные реакции образования продуктов белок : гидразон = 1 : 1 и 1 : 2 подтверждают этот вывод. Все модели, кроме единствен-



**Рис. 2.** Скорректированные на эффект внутреннего фильтра спектры эмиссии бычьего сывороточного альбумина: а)  $C_0(\text{БСА}) = 1.18 \times 10^{-5}$  моль/л; б)  $C_0(\text{БСА}) = 5.52 \times 10^{-6}$  моль/л при добавлении гидразона **PLP-4OH**: а)  $C_0(\text{PLP-4OH}) = 5.996 \times 10^{-4}$  моль/л; б)  $C_0(\text{PLP-4OH}) = 5.091 \times 10^{-4}$  моль/л. В обоих случаях начальный объем 2.5 мл, 10 добавок титранта по 10 мкл.

ной реакции между **PLP-4OH** и БСА в соотношении 1 : 1, оказались неадекватны и были отвергнуты.

Введение в систему, содержащую белок и гидразон, ионов  $\text{La}^{3+}$  существенно увеличивает количество параллельных равновесий в растворах. Сывороточные альбумины склонны к связыванию большого количества ионов  $d$ -элементов (например, до 14 катионов  $\text{Zn}^{2+}$  на 1 молекулу белка [20]); вероятно, это справедливо и для ионов лантанидов(III). Как было выше показано (рис. 2а, б), БСА связывает и свободный лиганд. Устойчивость комплексов  $\text{La}^{3+}$  с гидразоном

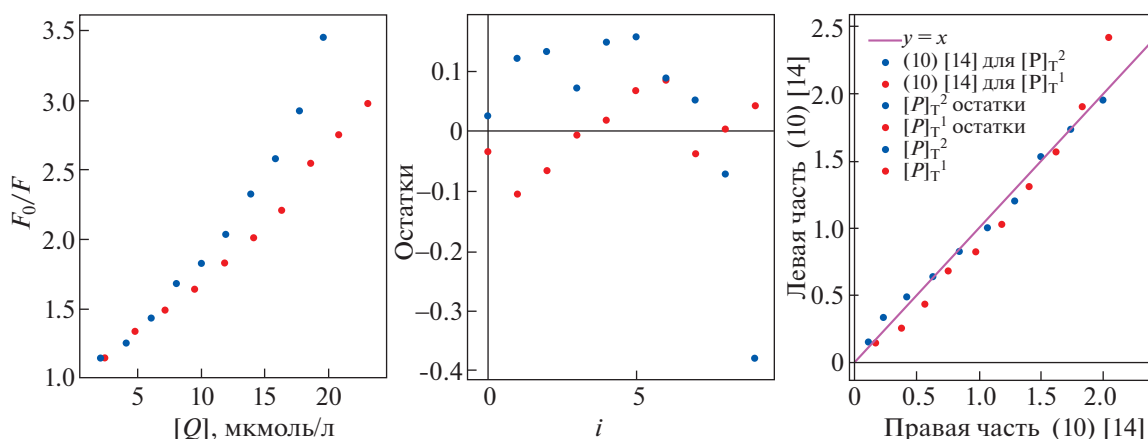


Рис. 3. Результаты обчета данных рис. 2 при помощи программного обеспечения [19].

**PLP-4OH** в буферном растворе ТРИС-НСI относительно невелика [9], следовательно, добавление белка к смеси гидразона и катиона будет приводить к смещению равновесия комплексообразования в сторону исходных продуктов. Наконец, возможно, хотя и маловероятно присоединение металлокомплекса как единого целого к белку.

Следовательно, происходящие при титровании раствором БСА смеси гидразона и ионов  $\text{La}^{3+}$  изменения в электронном спектре поглощения (рис. 4) необходимо интерпретировать с учетом следующих равновесий:

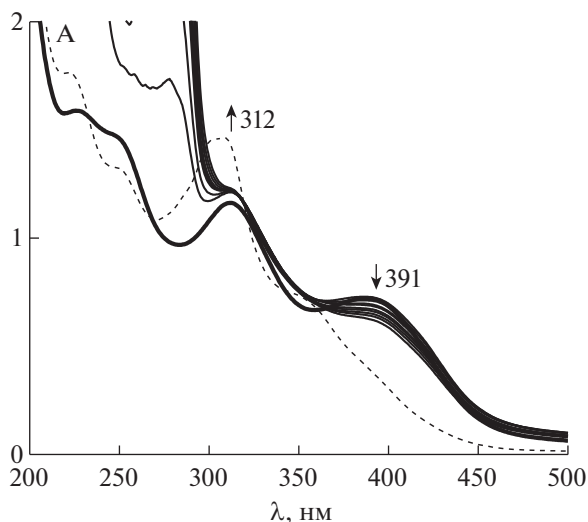
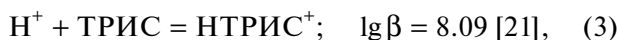
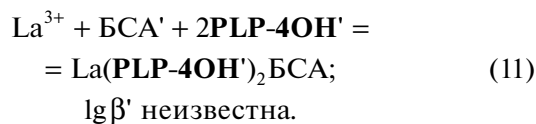
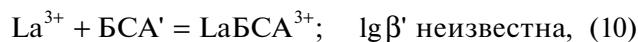
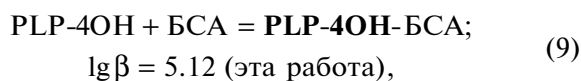
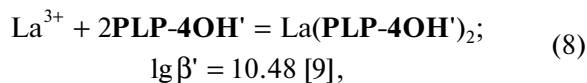
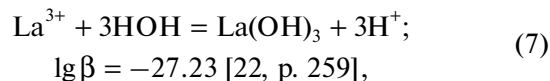
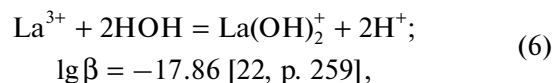
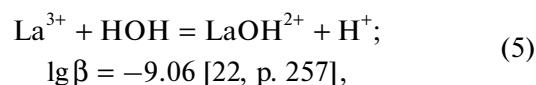
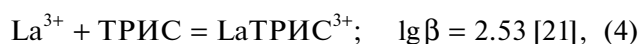


Рис. 4. Электронные спектры поглощения раствора гидразона **PLP-4OH**, его смеси с ионами  $\text{La}^{3+}$  и раствором БСА;  $C_0(\text{PLP-4OH}) = 8.061 \times 10^{-5}$  моль/л,  $C_0(\text{La}^{3+}) = 5.367 \times 10^{-5}$  моль/л,  $C_0(\text{БСА}) = 2.092 \times 10^{-5}$  моль/л. Начальный объем 2.7 мл, 9 добавок БСА по 20 мкл.



Символ ' означает, что рассматривается совокупность всех возможных протонированных форм вещества при данной pH среды.

Сравнивая спектр свободного лиганда (рис. 4, пунктир) со спектром после добавления ионов  $\text{La}^{3+}$ , можно видеть понижение интенсивности пика с максимумом при 300–310 нм и усиление светопоглощения при 391 нм. Последующее добавление белка, напротив, приводит к некоторому снижению оптической плотности при 391 нм и незначительному увеличению интенсивности

светопоглощения при 312 нм. Это может означать разложение металлокомплекса  $\text{La}^{3+}$ –**PLP-4ОН** и связывание высвобождающихся катионов и молекул лиганда белком. При этом, спектр смеси становится более похожим на электронный спектр поглощения свободного лиганда. Расчеты, проведенные в KEV [13], показывают, что наиболее адекватной моделью является набор реакций (3)–(9) либо (3)–(10); использование этой модели возвращает значение константы связывания гидразона с БСА  $\text{lg } \beta = 4.99 \pm 0.65$ , что близко к величине, определенной из спектрофлуориметрических данных. В то же время, процесс (10) не оказывает влияния на расчет; при титровании БСА раствором  $\text{LaCl}_3$  не наблюдалось изменений в электронном спектре поглощения белка. Следовательно, на основании данных спектрофотометрии невозможно утверждать точно, связываются ли ионы лантана(III) с бычьим сывороточным альбумином, а если связываются – какова константа этого равновесия. Лишь одно можно сказать наверняка: если данный процесс все же протекает, то его константа не может превышать  $\text{lg } \beta$  (9) – в противном случае, комплекс разрушался бы в более значительной степени, чем наблюдается по экспериментальным спектрам.

Таким образом, в настоящей работе исследовано взаимодействие в растворе пиридоксаль-5-фосфат 4-гидроксибензоилгидразона с бычьим сывороточным альбумином. Добавление гидразона к белку понижает интенсивность флуоресценции БСА, что не может быть объяснено динамическим тушением. Наиболее вероятной причиной наблюдаемого понижения интенсивности люминесценции является связывание лиганда с белком, приводящее к изменению конформации последнего и, как следствие, микроокружения остатков флуоресцентных аминокислот. Величина  $\text{lg } \beta$ , рассчитанная двумя методами по спектрофлуориметрическим данным, составляет 5.11–5.13. Показано, что добавление БСА к раствору, содержащему гидразон **PLP-4ОН** и ионы  $\text{La}^{3+}$ , приводит к разрушению металлокомплекса за счет связывания лиганда с белком.

Теоретическая часть работы и спектрофотометрические измерения выполнены в НИИ термодинамики и кинетики химических процессов Ивановского государственного химико-технологического университета в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (проект FZZW-2020-0009). Спектрофлуориметрический эксперимент выполнен при поддержке Совета по грантам при Президенте Российской Федерации (проект СП-1556.2021.4).

При этом использованы ресурсы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-671).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Percudani R., Peracchi A.* // EMBO Rep. 2003. V. 4. P. 850.  
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor914>
2. *Havaux M., Ksas B., Szewczyk A. et al.* // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. Article number 130.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-130>
3. *Geng M., Saito H., Katsuki H.* // Neurosci. Res. 1995. V. 24. P. 61.  
[https://doi.org/10.1016/0168-0102\(96\)81279-X](https://doi.org/10.1016/0168-0102(96)81279-X)
4. *Jun Y.W., Hebenbrock M., Kool E.T.* // Chem. Commun. 2020. V. 56. P. 317.  
<https://doi.org/10.1039/C9CC08458D>
5. *Richardson D.R., Milnes K.* // Blood. 1997. V. 89 (8). P. 3025.  
<https://doi.org/10.1182/blood.V89.8.3025>
6. *Chen X., Li H., Luo H. et al.* // Pharmacology. 2019. V. 104. P. 244.  
<https://doi.org/10.1159/000501630>
7. *Siqueira J.D., Pellegrin S.F., dos Santos S.S. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 204. Article number 110950.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110950>
8. *McFedries A., Schwaid A., Saghatelian A.* // Chem. & Biol. 2013. V. 20. P. 667.  
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.008>
9. *Гамов Г.А., Завалишин М.Н.* // Журн. неорган. химии. 2021. Т. 66. № 10. С. 1474.  
<https://doi.org/10.31857/S0044457X21100056>  
(*Gamov G.A., Zavalishin M.N.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2021. V. 66. № 10. P. 1561.  
<https://doi.org/10.1134/S0036023621100053>)
10. ThermoScientific. Extinction Coefficients: A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0006-Extinction-coefficients.pdf>).
11. *van de Weert M., Stella L.* // J. Mol. Struct. 2011. V. 998 (1–3). P. 144.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>
12. *van de Weert M.* // J. Fluoresc. 2010. V. 20. P. 625.  
<https://doi.org/10.1007/s10895-009-0572-x>
13. *Meshkov A.N., Gamov G.A.* // Talanta. 2019. 198. P. 200.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.107>
14. *Gayer A.V., Yakimov B.P., Budylin G.S., Shirshin E.A.* // J. Biomed. Photon. Eng. 2020. V. 6. № 2. Article number 3365.  
<https://doi.org/10.18287/JBPE20.06.020303>

15. *Mitra J., Metzler D.E.* // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1988. V. 965 (1). P. 93.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(88\)90156-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(88)90156-0)
16. *Echevarria-Gorostidi G.R., Basagoitia A., Pizarro E. et al.* // *Helv. Chim. Acta.* 1998. V. 81. P. 837.  
<https://doi.org/10.1039/P29890001617>
17. *Echevarria G.R., Basagoitia A., Santos J.B., Blanco F.G.* // *J. Mol. Cat. A.* 2000. V. 160. P. 209.  
[https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(00\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(00)00266-1)
18. *Гамов Г.А., Завалишин М.Н., Усачева Т.Р., Шарнин В.А.* // *Журн. физ. химии.* 2017. Т. 91. № 5. С. 800.  
<https://doi.org/10.7868/S0044453717050119> (*Гамов Г.А., Zavalishin M.N., Usacheva T.R., Sharnin V.A.* // *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2017. V. 91. № 5. P. 843.  
<https://doi.org/10.1134/S0036024417050107>).
19. <http://lid.phys.msu.ru/fluorescence-quenching/> (Доступ 2 августа 2021 г.)
20. *Zhou Y., Wang Y., Hu X. et al.* // *Biophys. Chem.* 1994. V. 51 (1). P. 81.  
[https://doi.org/10.1016/0301-4622\(94\)00032-8](https://doi.org/10.1016/0301-4622(94)00032-8)
21. *Гамов Г.А., Завалишин М.Н., Пименов О.А., Клочков В.В., Ходов И.А.* // *Inorg. Chem.* 2020. V. 59. Iss. 23. P. 17783.  
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03082>
22. *Ekberg C., Brown P.L.* *Hydrolysis of Metal Ions.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 2016. 917 p.