

УДК 54.03;544-971

## ИЗОТЕРМИЧЕСКОЕ КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА АДДУКТОМ C<sub>60</sub>-L-АРГИНИН

Е. И. Почкаева<sup>a,b,\*</sup>, Ю. А. Ануфриков<sup>a</sup>, В. П. Фаенкова<sup>c</sup>, В. В. Шаройко<sup>a,c</sup>,  
Н. А. Чарыков<sup>d</sup>, И. В. Мурин<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,  
Университетский пр. 26, Санкт-Петербург, 198504 Россия  
\*e-mail: evgeniyapochkaeva@gmail.com

<sup>b</sup> Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>c</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>d</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),  
Санкт-Петербург, Россия

Поступило в Редакцию 30 мая 2019 г.  
После доработки 30 мая 2019 г.  
Принято к печати 5 июня 2019 г.

Методом изотермической калориметрии титрования изучено взаимодействия между аддуктом фуллерена C<sub>60</sub> с L-аргинином и человеческим сывороточным альбумином (HSA). В результате проведенного исследования установлено образование комплекса C<sub>60</sub>-Arg-HSA со стехиометрическим соотношением 1:0.7.

**Ключевые слова:** фуллерен, аргинин, человеческий сывороточный альбумин, калориметрическое титрование

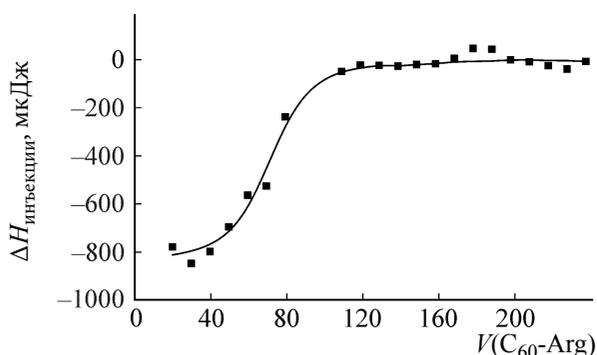
**DOI:** 10.1134/S0044460X19080237

Молекула фуллерена обладает высокой химической активностью благодаря большому числу свободных связей, способных присоединять различные радикалы [1, 2], демонстрирует способность проникать через клеточные мембраны [3], модулировать транспорт ионов [4], преодолевать гематоэнцефалический барьер [5, 6], проявлять адгезивную активность в сочетании с мембранотропной (что может быть использовано для получения новых иммуномодуляторов, адъювантов и носителей для вакцины, в том числе и для ВИЧ-антигенов) [3, 6, 7].

Одним из доказательств способности фуллеренов взаимодействовать с белками является образование фуллеренспецифических антител [8]. Данные рентгеноструктурного анализа Fab-фрагмента этих антител показывают, что фулле-

рен взаимодействует с белками по механизму индуцированного соответствия. В работе [9] было проведено экспериментальное и теоретическое исследование взаимодействия человеческого сывороточного альбумина [10] с фуллереном C<sub>60</sub> в водной среде. Результаты исследования показали, что фуллерен C<sub>60</sub> вызывает незначительные изменения конформации белка. Однако полигидроксилированный фуллерен C<sub>60</sub>(OH)<sub>44</sub> при связывании с белками вызывает их явные конформационные изменения и потерю их активности [11,12].

Белки выполняют в организме функцию универсального транспортера биологически активных соединений и микроэлементов [13], поэтому в рамках настоящего исследования была поставлена задача изучить взаимодействие между аддуктом фуллерена C<sub>60</sub> с L-аргинином и человеческим сы-



Зависимость теплового эффекта взаимодействия аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином при 298.15 К.  $\Delta H$  – тепловой эффект реакции,  $V(C_{60}\text{-Arg})$  – объем титранта.

вороточным альбумином. На рисунке представлена зависимость теплового эффекта реакции взаимодействия аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином при 298.15 К от объема титранта. На основе полученных экспериментальных данных были рассчитаны параметры взаимодействия аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином на основе термодинамической модели независимого связывания [14].

Полученное значение стехиометрии взаимодействия показывает, что в точке эквивалентности

Термодинамические характеристики связывания  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином при 298.15 К<sup>a</sup>

Термодинамический параметр	Численное значение
$K_d$ , М.	$1.7 \times 10^{-6}$
$n$	$0.7 \pm 0.07$
$\Delta H$ , кДж/моль	$-85.3 \pm 8.5$
$\Delta S$ , Дж/(моль · К)	$-175 \pm 17.5$
$\Delta G$ , кДж/моль	$-33.0 \pm 3.3$
$-T\Delta S$ , кДж/моль	$-52.3 \pm 5.2$
$K_a$ , 1/М.	$6.0 \times 10^5$

<sup>a</sup>  $K_d$  – константа диссоциации,  $K_a$  – константа связывания,  $n$  – стехиометрический коэффициент связывания  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$  – изменение энтальпии, энтропии и энергии Гиббса в результате связывания аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином,  $T$  – абсолютная температура.

на 1 моль титруемого вещества (HSA) приходится 0.7 моль титранта ( $C_{60}$ -Arg) (см. таблицу). Это можно объяснить особенностями структуры изучаемого белка, а именно недоступностью некоторых сайтов связывания в силу стерического фактора. Рассчитанная константа связывания  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином ( $K_a = 6.0 \times 10^5$  1/М.) сопоставима с константой связывания, полученной спектрофлуориметрическим методом ( $K_a = 14.84 \times 10^4$  1/М.). Следует отметить, что полученное значение лежит в эффективном диапазоне  $10^4$ – $10^5$  моль/дм<sup>3</sup>, что, в свою очередь, свидетельствует о способности альбумином выполнять транспортные функции в кровотоке.

Из представленных значений термодинамических параметров (см. таблицу) видно, что взаимодействие аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином является экзотермическим процессом. Отрицательные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  являются типичными при образовании водородных связей, поэтому связывание аддукта  $C_{60}$ -Arg с человеческим сывороточным альбумином происходит за счет аргининовых остатков фуллеренового аддукта.

Таким образом, установлено, что человеческий сывороточный альбумин связывается с аддуктом  $C_{60}$ -Arg в стехиометрическом соотношении 1:0.7 с  $K_a = 6.0 \times 10^5$  1/М. Человеческий сывороточный альбумин является одним из важнейших транспортных белков и играет ключевую роль в транспорте жирных кислот, метаболитов и лекарств, поэтому полученные результаты важны для дальнейшего применения производного  $C_{60}$ -Arg в биомедицине.

Аддукт фуллерена  $C_{60}$ -Arg синтезировали в соответствии с методиками, описанными в работах [15, 16]. Дополнительно была проведена идентификация коммерческого продукта  $C_{60}$ -Arg (МСТ «Нано», Россия).

**Аддукт  $C_{60}$ -L-аргинин.** ИК спектр,  $\nu$ , см<sup>-1</sup>: 3430 (NH), 3187 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 1638 (C–N), 1574, 1401 (COO<sup>-</sup>), 1190 (N–C<sub>60</sub>), 527 (C<sub>60</sub>). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C,  $\delta_C$ , м. д.: 27.5, 43.1 (CH<sub>2</sub>), 56 (CH), 158 (C{N<sub>3</sub>}), 176.4 (COOH), 139.6, 76.2, 63.7 и 16.4 (C<sub>60</sub>), 76.2 (HC<sub>60</sub>). Масс-спектр,  $m/z$ : 2112.5 [ $M - H$ ]<sup>+</sup>, 1936.4, 1765.1, 1591.3, 1412.3, 1242.0, 1067.9, 890.4, 720.8. Найдено, %: С 61.35; Н 5.37; N 21.20.

$C_{108}H_{112}N_{32}O_{16}$ . Вычислено, %: С 61.35; Н 5.34; N 21.20.

Результаты комплексного термического анализа аддукта  $C_{60}$ -Arg показали, что в температурном диапазоне до 340 К аддукт является термически устойчивым. В интервале температур 340–950 К происходят многоступенчатые процессы разложения производного (в присутствии  $O_2$ ), включающие дегидратацию ( $-nH_2O$ ), декарбоксилирование ( $-nCO_2$ ), деазотирование ( $-N_2$ ) и дегидрирование ( $-H_2$ ). Общая потеря массы, составляющая 65.9%, соответствует отщеплению восьми остатков L-аргинина. В интервале температур 950–1270 К происходит окисление фуллеренового ядра [17].

Спектры ЯМР  $^{13}C$  регистрировали на приборе Bruker Avance III 400 WB (100.64 МГц) с использованием тетраметилсилана в качестве внешнего стандарта. ИК спектры снимали на приборе Shimadzu FTIR-8400S в таблетках с KBr. Масс-спектры регистрировали на приборе Agilent 1100 LC/MSD Trap. Комплексный термический анализ проводили на приборе Shimadzu DTG-60H при 303.62–1274.95 К. Элементный состав определяли на приборе Euro EA3028-HT.

Для проведения изотермического титрования использовали следующие реагенты: аддукт  $C_{60}$ -Arg (МСТ «Нано», Россия), человеческий сывороточный альбумин (Биолот, Россия), раствор Дульбекко (Биолот, Россия) [11]. Изучение взаимодействия человеческого сывороточного альбумина и аддукта фуллерена  $C_{60}$ -Arg проводили при 298.15 К методом изотермической калориметрии титрования с использованием прибора Nano ITC 2G (TA Instruments, США), оснащенного золотой измерительной ячейкой объемом 1 мл. Для проведения измерений в ячейку помещали раствор человеческого сывороточного альбумина ( $c = 1 \times 10^{-4}$  моль/л). После установления равновесия к содержимому ячейки при непрерывном перемешивании добавляли раствор аддукта  $C_{60}$ -Arg ( $c = 1 \times 10^{-3}$  моль/л) путем последовательных инъекций по 10 мкл. В качестве среды для протекания изучаемой реакции использовали фосфатный буферный раствор Дульбекко. Интервал между инъекциями составлял 2400 с, скорость вращения мешалки – 250 об/мин. Точность поддержания температуры в ходе эксперимента составляла  $\pm 0.0003$  К [11].

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета «Методы анализа состава вещества» и «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования».

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krusic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F.* // Science. 1991. Vol. 254. P. 1183. doi 10.1126/science.254.5035.1183
2. *Morton J.R., Negri F., Preston K.F.* // Acc. Chem. Res. 1998. Vol. 31. P. 63. doi 10.1021/AR950120P
3. *Rašović I.* // Mater. Sci. Technol. 2017. Vol. 33. P. 777. doi 10.1080/02670836.2016.1198114
4. *Goodarzi S., Da Ros T., Conde J., Sefat F., Mozafari M.* // Mater. Today. 2017. Vol. 20. P. 460. doi 10.1016/J.MATOD.2017.03.017
5. *Hsieh F.-Y., Zhilenkov A.V., Voronov I.I., Khakina E.A., Mischenko D.V., Troshin P.A., Hsu S.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. Vol. 9. P. 11482. doi 10.1021/acsaami.7b01077
6. *Castro E., Garcia A.H., Zavala G., Echegoyen L.* // J. Mater. Chem. (B). 2017. Vol. 5. P. 6523. doi 10.1039/C7TB00855D
7. *Zhu X., Xiao S., Zhou D., Sollogoub M., Zhang Y.* // Eur. J. Med. Chem. 2018. Vol. 146. P. 194. doi 10.1016/J.EJMECH.2018.01.040
8. *Пиотровский Л.Б.* // Рос. нанотехнол. 2007. Т. 2. № 7–8. С. 6.
9. *Li S., Zhao X., Mo Y., Cummings P.T., Heller W.T.* // J. Nanoparticle Res. 2013. Vol. 15. N 2. P. 1. doi 10.1007/s11051-013-1769-0
10. *Brown J.R.* Serum albumin: amino acid sequence. London: Pergamon Press, 1977. P. 27. doi 10.1016/B978-0-08-019603-9.50009-0
11. *Yang L.-Y., Hua S.-Y., Zhou Z.-Q., Wang G.-C., Jiang F.-L., Liu Y.* // Colloids Surfaces (B). 2017. Vol. 157. P. 261. doi 10.1016/j.colsurfb.2017.05.065
12. *Zhang M.-F., Xu Z.-Q., Ge Y.-S., Jiang F.-L., Liu Y.* // J. Photochem. Photobiol. (B). 2012. Vol. 108. P. 34. doi 10.1016/j.jphotobiol.2011.12.006

13. Орлова М.А., Трофимова Т.П., Орлов А.П., Шаталов О.А., Свистунов А.А., Наполов Ю.К., Чехонин В.П. // Онкогематология. 2013. Т. 8. № 1. С. 65.
14. Herrera I., Winnik M.A. // J. Phys. Chem. (B). 2013. Vol. 117. P. 8659. doi 10.1021/jp311812a
15. Hu Z., Guan W., Wang W., Huang L., Tang X., Xu H., Zhu Z., Xie X., Xing H. // Carbon. 2008. Vol. 46. P. 99. doi 10.1016/j.carbon.2007.10.041
16. Jiang G., Yin F., Duan J., Li G. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2015. Vol. 26–24. N 1. P. 5384. doi 10.1007/s10856-014-5348-4
17. Iurev G.O., Lelet M.I., Pochkaeva E.I., Petrov A.V., Semenov K.N., Charykov N.A., Podolsky N.E., Dulneva L.L., Sharoyko V.V., Murin I.V. // J. Chem. Thermodyn. 2018. Vol. 127. P. 39. doi 10.1016/j.jct.2018.07.007

## Isothermal Calorimetric Titration of Human Serum Albumin with The Fullerene C<sub>60</sub>-L-Arginine Adduct

E. I. Pochkaeva<sup>a, b, \*</sup>, Yu. A. Anufrikov<sup>a</sup>, V. P. Faenkova<sup>c</sup>, V. V. Sharoik<sup>a, c</sup>,  
N. A. Charykov<sup>d</sup>, and I. V. Murin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, Universitetskii pr. 26, St. Petersburg, 198504 Russia

\*e-mail: evgeniyapochkaeva@gmail.com

<sup>b</sup>Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>d</sup>St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russia

Received May 30, 2019; revised May 30, 2019; accepted June 5, 2019

The interaction between fullerene C<sub>60</sub>-L-arginine adduct and human serum albumin (HSA) was studied using isothermal calorimetric titration at 298.15 K. As a result, the formation of a C<sub>60</sub>-Arg-HSA complex with a stoichiometric ratio of 1:0.7 was revealed.

**Keywords:** fullerene, arginine, human serum albumin, calorimetric titration