

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной  
научно-квалификационной работы (диссертации)

**Модулирование связывающей и эстеразной активности  
сывороточного альбумина**

**Баталова Анастасия Александровна**

06.06.01 - Биологические науки

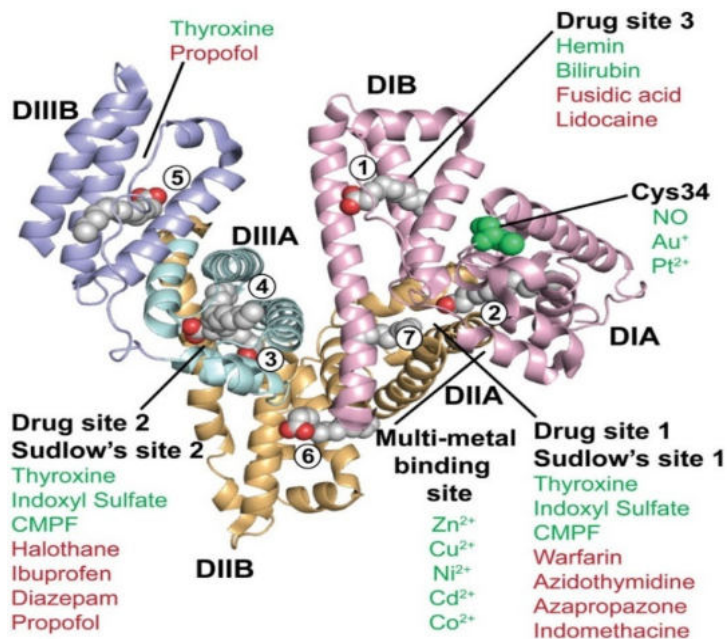
03.01.04 - биохимия

Научный руководитель  
д.б.н. Гончаров Николай  
Васильевич

ИЭФБ РАН  
Санкт-Петербург, 2021

## Актуальность.

Сывороточный альбумин (СА) является мажорным белком крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500-700 мкм. Он поддерживает коллоидно-осмотическое давление, выполняет резервную функцию, играет важную роль в транспортировке воды, различных ионов и соединений (Fasano et al, 2005). Выявлены три основных сайта взаимодействия альбумина с лигандами (Садлоу I, Садлоу II и сайт III) (Рисунок 1), а также несколько вторичных сайтов. Альбумин представляет собой довольно сложную молекулу, состоящую из трех доменов, каждый из которых состоит из двух субдоменов. Трехмерная структура СА достаточно лабильна, и при взаимодействии с разными веществами имеют место кооперативность и аллостерическая модуляция, присущие мультимерным белкам.



**Рисунок 1.** Структура молекулы альбумина и основные сайты связывания (Sand et al., 2015). Первичные сайты связывания лигандов: Sudlow site 1 – сайт Садлоу I с каталитическим тирозином Tyr150 (Tyr149 для бычьего альбумина) и Sudlow site 2 – сайт Садлоу II с каталитическим тирозином Tyr411 (Tyr410 для бычьего альбумина). Цифрами 1-7 обозначены сайты связывания жирных кислот. DIA, DIB, DIIA, DIIIB, DIIIA, DIIIB – структурные домены альбумина. Также обозначены некоторые вторичные сайты связывания лигандов. Указаны основные эндогенные (указаны зеленым шрифтом) и экзогенные (красным шрифтом) лиганды связывающих сайтов белка.

Предположение о том, что наряду со связывающей способностью альбумин обладает гидролитической активностью, было выдвинуто в научной литературе еще в конце 1950-х. С того времени накапливаются данные, что наряду со связывающей способностью, СА обладает эстеразной (связывание субстрата с активным центром альбумина с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) и псевдоэстеразной активностью (необратимое ковалентное связывание субстрата с белком) (Гончаров и др., 2015; Rabbani, Ahn, 2019). Известно, что сайт Садлоу II с каталитическим Tyr411 отвечает за псевдоэстеразную активность белка (Li et al, 2008; Lockridge et al., 2008). Ранее было высказано предположение, что сайт Садлоу I с каталитическим Tyr150 отвечает за истинно эстеразную активность альбумина (Белинская и др., 2014; Гончаров и др., 2015). Тем не менее, молекулярные механизмы гидролитической активности альбумина до конца не определены.

В токсикологии наибольший интерес представляет проблема (псевдо)эстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС) – эфирам фосфорной или фосфоновой кислот. Следует отметить, что основными ферментами, участвующими в детоксикации ФОС и карбаматов, являются фосфотриэстеразы, к которым относится параоксоназа-1 (PON-1), а также карбоксилэстеразы (КЭ). В отличие от грызунов, в крови человека содержание КЭ крайне мало, и, по всей видимости, функции этого фермента выполняет альбумин. По этим причинам *n*-нитрофенилацетат (НФА, классический субстрат для изучения КЭ), и параоксон (один из субстратов PON-1) широко применяются для изучения эстеразной активности альбумина. Еще одним важным преимуществом использования данных соединений для изучения ферментативной активности альбумина является тот факт, что продукт их гидролиза нитрофенол имеет желтую

окраску с пиком поглощения при длине волны 400-405 нм и может быть детектирован спектрофотометрическими методами.

Молекула альбумина в норме не покрыта углеводной оболочкой, и потому она может связывать многие известные лекарственные препараты и токсические вещества, в значительной степени определяя их фармако- и токсикокинетику. При создании новых фармпрепаратов анализ их взаимодействия с альбумином — один из обязательных этапов. Однако при разработке и тестировании лекарственных средств, взаимодействующих с альбумином, редко учитывают тот факт, что условия кровеносного русла отличаются от условий идеального раствора. Необходимо принимать во внимание и лекарственные взаимодействия, а также межвидовые различия, поскольку биохимические эксперименты нередко проводят на дешевом бычьем альбумине, а доклиническое тестирование — на грызунах. Поэтому проблема того, как реальные условия, различные ксенобиотики и нутрицевтики влияют на связывающую и эстеразную активность альбумина, является актуальной.

**Цель** настоящей работы — биохимическими, спектроскопическими и вычислительными методами исследовать влияние различных модуляторов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина человека (ЧСА), быка (БСА) и крысы (КСА).

Для достижения данной цели поставлены и решены следующие *задачи*:

- 1) С применением технологии протонного ядерно-магнитного резонанса продемонстрировать наличие у молекулы альбумина истинной эстеразной активности.
- 2) Биохимическими методами *in vitro* изучить характер влияния различных модуляторов связывающей и гидролитической активности альбумина по отношению к параоксону и его нетоксичному аналогу *n*-нитрофенилацетату (НФА).

3) Методами компьютерного моделирования *in silico* определить молекулярные механизмы модуляции связывающей и гидролитической активности альбумина.

### **Положения, 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 зеленого чая 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.

### **Научная новизна**

В данной работе с помощью метода ядерно-магнитного резонанса впервые продемонстрировано наличие у сывороточного альбумина истинной эстеразной активности. С применением биохимических и расчетных методов впервые проведено системное исследование влияния различных модуляторов на связывающую и гидролитическую активность

альбуминов разных видов и молекулярных механизмов, обуславливающих аллостерические эффекты в альбумине.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Доказательство существования у сывороточного альбумина эстеразной активности открывает новые возможности для фундаментальных исследований эволюционной роли сывороточного белка в жизнедеятельности высших животных, а так же перспективы использования ферментативных свойств альбумина в фармакологии и токсикологии при разработке и тестировании различных препаратов, связывающихся с альбумином в кровеносном русле. Знания о веществах, способных модулировать (усиливать/ослаблять) связывающую способность и/или эстеразную активность альбумина могут оказаться основой для разработки новых более безопасных и эффективных препаратов для терапии различных заболеваний или токсических поражений организма.

### **Апробация работы**

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 молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2020; Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 2021.

### **Личный вклад**

Автор принимала участие в экспериментах, представленных в данной работе, проводила статистическую обработку полученных результатов, участвовала в написании тезисов и статей, представляла

результаты на конференциях. Ряд работ выполнен при участии сотрудников Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, а так же сотрудников Ресурсного Центра Санкт-Петербургского Государственного университета «Магнитно-резонансные методы исследования». Работы были поддержаны грантами РФФИ. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 5 печатных работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### Материалы и методы

*ЯМР спектроскопия.* ЯМР измерения проводили в Ресурсном центре «Магнитно-резонансные методы исследования» СПбГУ. В день эксперимента готовили раствор БСА в фосфатно-солевом буфере (ФБ) с добавлением оксида дейтерия. Перед снятием спектра к раствору БСА добавляли внутренний стандарт триметилсилилпропансульфонат натрия (DSS) и субстрат *n*-нитрофенилацетат (НФА). В качестве контроля использовали раствор НФА в ФБ без добавления альбумина. Приготовленные образцы сканировали методом одномерного <sup>1</sup>H-ЯМР при комнатной температуре на спектрометре Bruker Avance III 500 ЯМР с подавлением сигнала воды. Спектр снимали каждые 3 мин в течение 50 мин. Химические сдвиги  $\delta$  компонентов раствора с точностью до 0.001 м.д. калибровали по тетраметилсилану Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Зависимость концентрации ацетата (продукта истинно эстеразной реакции альбумина по отношению к НФА) от времени оценивали по относительной интенсивности пика с химическим сдвигом 1.85 м.д., соответствующего этому соединению.

*Определение кинетических параметров гидролиза НФА в присутствии альбумина.* Активность альбумина относительно НФА и параоксона определяли спектрофотометрически (408 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 (предстадионарной) рассчитывали скорость в диапазоне 0-60 секунд. Для второй фазы (стадионарной) рассчитывали скорость в диапазоне 300-900 секунд. Полученные данные подвергали первичной обработке в MS Excel. Далее рассчитанные значения скоростей реакции переносили в программу GraphPad Prism. 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 Михаэлис-Ментен.

*Влияние окисления свободных тиоловых групп БСА на его связывающую и эстеразную активность.* Для определения свободных тиоловых групп использовали реактив Элмана (5,5-дитио-бис-(2-нитробензойная кислота)), который вступает в реакцию в стехиометрическом соотношении. Химизм процесса заключается в образовании продукта реакции, 2-нитро-5-сульфанилбензойной кислоты, которая переходит в хиноидную форму, поглощающую свет при длине волны 412 нм. Количество свободных тиоловых групп в БСА определяли помощью калибровочного графика, построенного с известными концентрациями цистеина гидрохлорида. Для учета потери белка при фильтрации на следующем этапе строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации БСА до фильтрации. Зависимость имеет линейный характер, величина коэффициента детерминации  $R^2$  составляет 0.994. С помощью полученной зависимости определили, что потери БСА на фильтре составили в среднем 16,2% ( $n=3$ ).

Для восстановления свободных тиоловых групп БСА (10 мкМ) использовали дитиотреитол (ДТТ). В работе (Funk et al., 2010) было подобрано оптимальное соотношение ЧСА-ДТТ, при котором



восстанавливалось максимальное количество Cys-34 и при этом не восстанавливались внутримолекулярные дисульфидные связи. Опираясь на опубликованные данные, в своей работе с БСА мы взяли такой же диапазон соотношений – от 1:1 до 1:10 по молярному количеству веществ для подбора оптимального соотношения. По уравнению калибровочного графика из значения оптической плотности была рассчитана концентрация свободных тиоловых групп в восстановленном белке. Трёхкратного избытка ДТТ по отношению к БСА, так же как и в работе (Funk et al., 2010), оказалось достаточно для восстановления максимального количества Cys-34.

Для окисления свободных тиоловых групп БСА (360 мкМ) использовали этакриновую кислоту (ЭК). Соотношение БСА-ЭК варьировали в диапазоне от 1:1 до 1:7. Анализ свободных тиоловых групп в альбумине в зависимости от концентрации ЭК показал, что оптимальным соотношением БСА:ЭК является 1:5, это же подтверждается данными литературы (Vertucci et al, 1998).

*Влияние модуляторов на эстеразную активность сывороточного альбумина.* Исследование влияния модуляторов (ЖК, полифенолов, фармакологических препаратов) на эстеразную активность альбумина проводили в режиме предварительной инкубации исследуемого модулятора в растворе альбумина в течение 30 мин при  $t = 25^{\circ}\text{C}$ . В контрольной пробе содержался ФБ.

*Молекулярные механизмы аллостерических эффектов в альбумине по данным молекулярного моделирования. Подготовка трёхмерных моделей.* Трёхмерные модели лигандов были построены и оптимизированы методом скорейшего спуска с помощью программы HyperChem 8.0 (Froimowitz, 1993). В качестве трёхмерных моделей ЧСА и БСА использовали данные рентгеноструктурного анализа из базы данных белковых структур (Protein Data Bank), коды структур 2bxd, 2bxg, 4jk4.

Трехмерная модель КСА была построена ранее методом гомологичного моделирования (Таборская и др., 2017).

Модель цистеинилированного БСА (cysБСА) конструировали следующим образом. На основании имеющейся информации о зарядах на атомах, длинах связей, значениях валентных и торсионных углов для разных типов атомов и атомных групп, представленной в базе данных программного пакета GROMACS (Abraham et al., 2015), была описана топология аминокислотного остатка цистеина, связанного через дисульфидную связь со свободным цистеином. Подготовленная топология была добавлена в библиотеку структур аминокислот этого пакета. Затем провели молекулярный докинг молекулы свободного цистеина в сайт Cys34 молекулы БСА. На основании внесенной в библиотеку топологии из полученного методом молекулярного докинга комплекса, программой GROMACS была сгенерирована структура цистеинилированного БСА, которую затем оптимизировали методом минимизации энергии. Подготовленные 3d-модели белков и лигандов на следующем шаге использовали для процедуры молекулярного докинга.

*Метод молекулярного докинга.* Метод молекулярного докинга представляет собой так называемую «стыковку» молекулы лиганда в центре связывания белка (или иначе мишени) с целью поиска локального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком. Метод позволяет определить функциональные особенности поверхности мишени и особенности взаимодействия молекул в комплексе, найти лиганды к конкретной мишени среди большого числа молекул или создать новые лиганды, способные эффективно взаимодействовать с данной мишенью. 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.

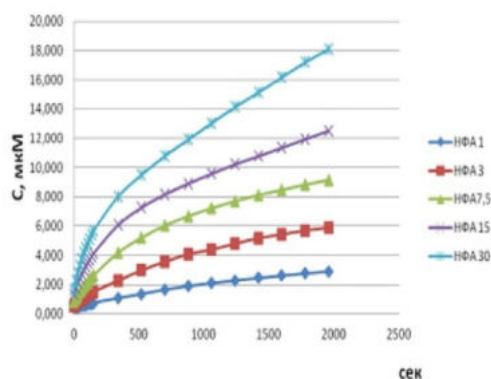
*Молекулярная динамика.* Конформационные изменения комплексов альбумина с лигандами во времени были рассчитаны методом молекулярной динамики с помощью программного пакета GROMACS (Abraham et al., 2015). Каждый комплекс виртуально был помещен в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал SPC (single point charge) (Berendsen et al., 1981). Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия. В расчетном эксперименте поддерживалась постоянная температура 300 К и постоянное давления 1 бар с помощью термостата «V-rescale» (Bussi et al., 2009) и баростата Берендсена (Berendsen et al., 1984) с временными константами 0,1 пс и 1 пс, соответственно. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда (Darden et al., 1993). При межатомном расстоянии больше 1 нм взаимодействия Леннард-Джонса пренебрегали. Длины связей в молекулах альбумина и лигандов поддерживались постоянными с помощью алгоритма LINCS (Hess et al., 1997). 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. Реакцию между белком и лигандом считали потенциально возможной (или, другими словами, фермент-субстратный комплекс считали продуктивным) в случае сближения каталитической аминокислоты и лиганда ближе, чем на 0.4 нм.

*Оценка свободной энергии связывания.* Расчет свободной энергии связывания лигандов с альбумином проводили методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона-

Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzmann surface area, MM-PBSA) (Genheden, Ryde, 2015) с помощью модуля g\_mmpbsa (Kumari, Kumar, 2014), встроенного в программный пакет GROMACS. Метод MM-PBSA позволяет из траекторий молекулярной динамики оценить энергию образования комплекса белок-лиганд. В течение симуляции молекулярной динамикой происходят очень большие колебания энтропии, и расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с экспериментальными данными, чем расчет полной свободной энергии. Поэтому мы рассчитывали только энтальпийную составляющую свободной энергии образования комплекса (Kumari, Kumar, 2014). Значение свободной энергии образования комплекса вычисляли с шагом 100 пс в течение симуляции. Итоговое значение рассчитывали как среднее  $\pm$  стандартное среднее отклонение. Вышеописанные методы (с незначительными коррективами под каждую конкретную задачу) мы использовали во всех наших вычислительных экспериментах.

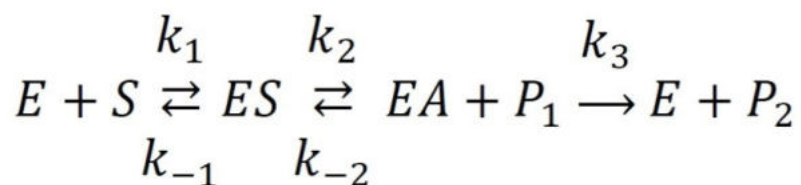
## Результаты и обсуждение

*Эстеразная активность сывороточного альбумина по данным ЯМР и молекулярного моделирования.* Большинство исследователей связывает наличие истинной эстеразной активности у альбумина с медленным деацилированием Tyr411 (Гончаров и др., 2015; Белинская, Гончаров, 2020). Первая публикация, в которой было обосновано существование в молекуле альбумина по меньшей мере двух разных центров (сайтов), отвечающих за два вида активности, истинно- и псевдоэстеразную, появилась в 1972 г. (Tildon, Ogilvie, 1972). Взаимодействие альбумина с НФА имеет двухфазный характер: в течение первых минут наблюдается "всплеск" активности, т.е. происходит быстрое образование продукта реакции нитрофенола, после чего система переходит в стационарный режим, но не выходит на плато (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Кинетика гидролиза НФА при различных концентрациях (мкМ) (Шмурак, 2018)

В 2015 г. была предложена схема взаимодействия НФА с альбумином (Гончаров и др., 2015):



**Схема 1.** Взаимодействие между альбумином и *n*-нитрофенилацетатом. S – субстрат, P1 – *n*-нитрофенол, P2 – ацильная группа.

Работа каждого сайта Садлоу может быть описана этой схемой: на первом этапе взаимодействия субстрат связывается с сайтом с образованием фермент-субстратного комплекса ES, затем происходит высвобождение продукта *n*-нитрофенола (P1) и ацетилирование фермента (EA), и на последнем этапе происходит деацетилирование альбумина и высвобождение ацетата (P2). Принципиальное отличие между псевдоэстеразной и истинно эстеразной активностью состоит лишь во времени жизни ацетилированного фермента EA, т.е. основная разница в наблюдаемой кинетике выхода продукта обусловлена константой  $k_3$ , характеризующей реакцию деацетилирования. Время полужизни ацетилированного Tyr411, отвечающего за псевдоэстеразную активность, составляет  $61 \pm 4$  часа (Lockridge et al., 2008), а в случае истинно эстеразного катализа комплекс EA – это, по всей видимости,

короткоживущий тетраэдрический интермедиат, аналогичный тому, который образуется в процессе гидролиза ацетилхолина ацетилхолинэстеразой (Zhang et al., 2002).

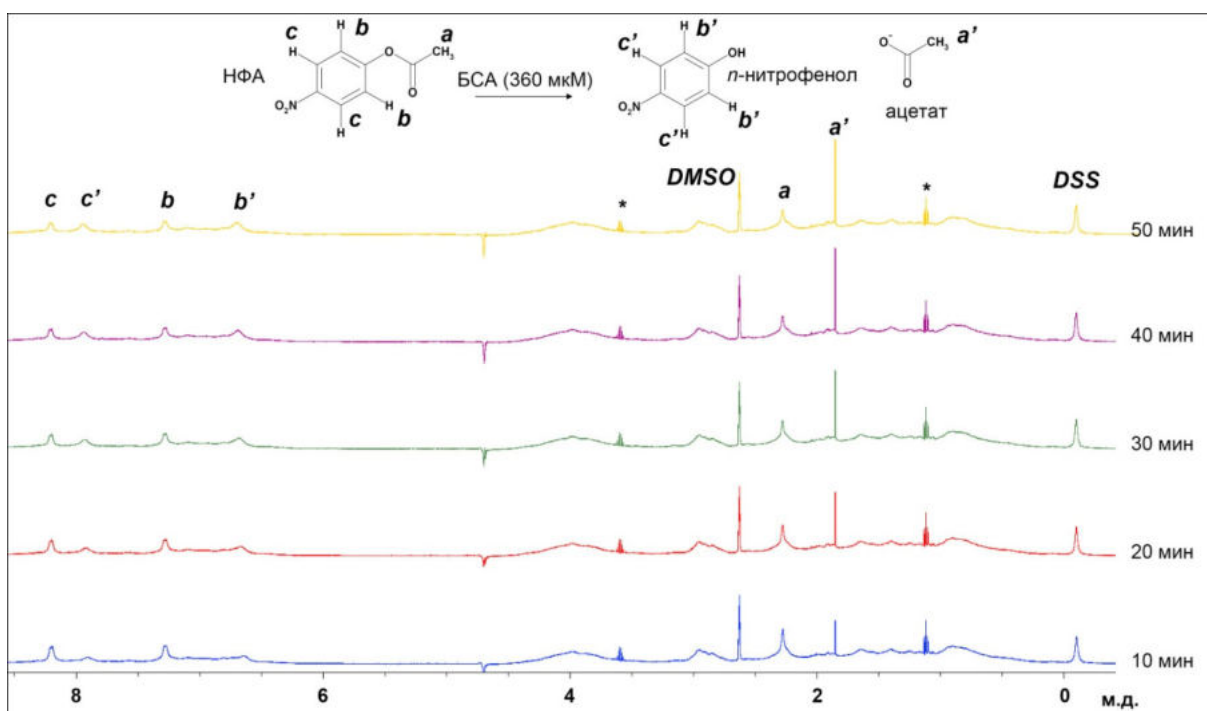
Более того, если пренебречь коротким временем жизни ацетилированного сайта истинной эстеразной активности и пренебречь незначительной скоростью деацетилирования Tyr411, то с помощью предложенной схемы можно описать всю гидролитическую активность альбумина в двух сайтах. На первом этапе взаимодействия альбумина с субстратом происходит его адсорбция в сайте Садлоу II (ES), быстрое высвобождение продукта *n*-нитрофенола (P1), отмечаемое как «всплеск» активности, и ацетилирование тирозина Tyr411 (EA). На втором этапе субстрат связывается с сайтом эстеразной активности альбумина, где происходит его гидролиз до ацетата (P2) и *n*-нитрофенола (P1).

Здесь необходимо отметить, что определенный вклад в «кажущуюся» кинетику обоих сайтов альбумина вносит т.н. элиминация Кемпа – прототипная реакция отщепления протона от углерода, которая, вероятно, имеет место вблизи других сайтов, количество которых может исчисляться десятками. Реакция происходит в слое Штерна, на границе раздела между головкой мицеллы или поверхностью белка и водой, так что значительное ускорение реакции может быть достигнуто независимо от пространственного расположения субстрата (Sanchez et al., 2016; Sakamoto et al., 2017). Известно, что скорость реакции снижается в протонных растворителях, таких как вода, по сравнению с апротонными органическими растворителями; электростатическая составляющая водородных связей является основным фактором ингибирующего действия воды, тогда как внешнее электрическое поле, ориентированное в направлении переноса заряда, увеличивает скорость реакции (Acosta-Silva et al., 2020). С другой стороны, механизм элиминации Кемпа в белковых молекулах связан с присутствием остатков ароматических аминокислот

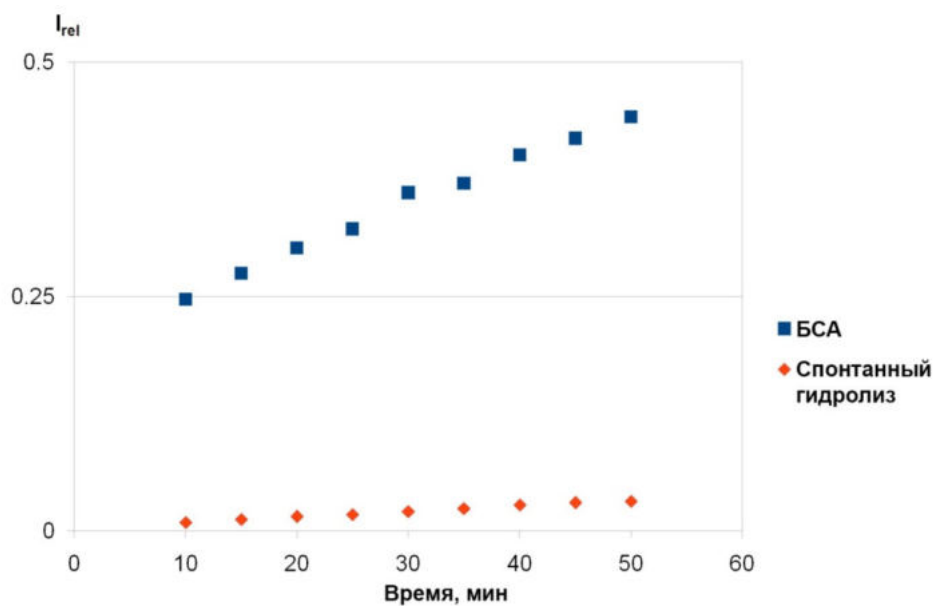
(Trp, Tyr, Phe), обеспечивающих стэкинг-взаимодействие с донорами водородной связи (Lys, Arg, Ser, Tyr, His, молекула воды) (Röthlisberger et al., 2008). Ранее было предложено объяснение опосредованного альбумином гидролиза некоторых субстратов существованием каталитических диад (в отличие от каталитических триад в холинэстеразах) His-Tyr или Lys-Tyr, в которых остатки гистидина или лизина функционируют как кислотные остатки и доноры протона, а остаток тирозина является каталитическим основанием (Гончаров и др., 2015). Создание всеобъемлющей математической модели для описания (псевдо)эстеразной активности альбумина, которая бы учитывала все типы взаимодействия во всех возможных сайтах с учетом элиминации Кэмпса, представляет собой весьма нетривиальную задачу, решение которой выходит далеко за рамки настоящей работы.

Для доказательства существования истинно эстеразной активности необходимо зарегистрировать не только выход нитрофенильной группы, но и ацетатной, которая не является хромогенной. Такие попытки предпринимались неоднократно, но безуспешно. В представленном исследовании впервые с помощью ЯМР по кинетике выхода ацетатной группы показано, что альбумин обладает истинной эстеразной активностью. На спектре ЯМР (Рисунок 3) видно, как с течением времени происходит уменьшение в растворе количества исходного субстрата (НФА) и нарастание количества продуктов реакции нитрофенильной и ацетатной группы.

Зависимость интенсивности сигнала ацетатной группы от времени в случае спонтанного гидролиза НФА и гидролиза в присутствии альбумина изображена на следующем рисунке (Рисунок 4).



**Рисунок 3.** Кинетика гидролиза *p*-нитрофенилацетата (НФА) в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА). DMSO – диметилсульфоксид, DSS – триметилсилилпропансульфонат натрия, м.д. – миллионная доля.



**Рисунок 4.** Зависимость относительной интегральной интенсивности  $I_{rel}$  сигнала ацетата в реакционной смеси в присутствии и в отсутствие БСА.  $I_{rel}$  рассчитывали как отношение интегральной интенсивности сигнала ацетата ( $I_{acetate}$ ) к интегральной интенсивности сигнала внутреннего стандарта триметилсилилпропансульфоната натрия ( $I_{DSS}$ ):  $I_{rel} = I_{acetate}/I_{DSS}$ .

Согласно полученным данным, накопление ацетата в присутствии БСА в реакционной смеси происходит значительно интенсивнее по сравнению со спонтанным гидролизом НФА. Полученные данные



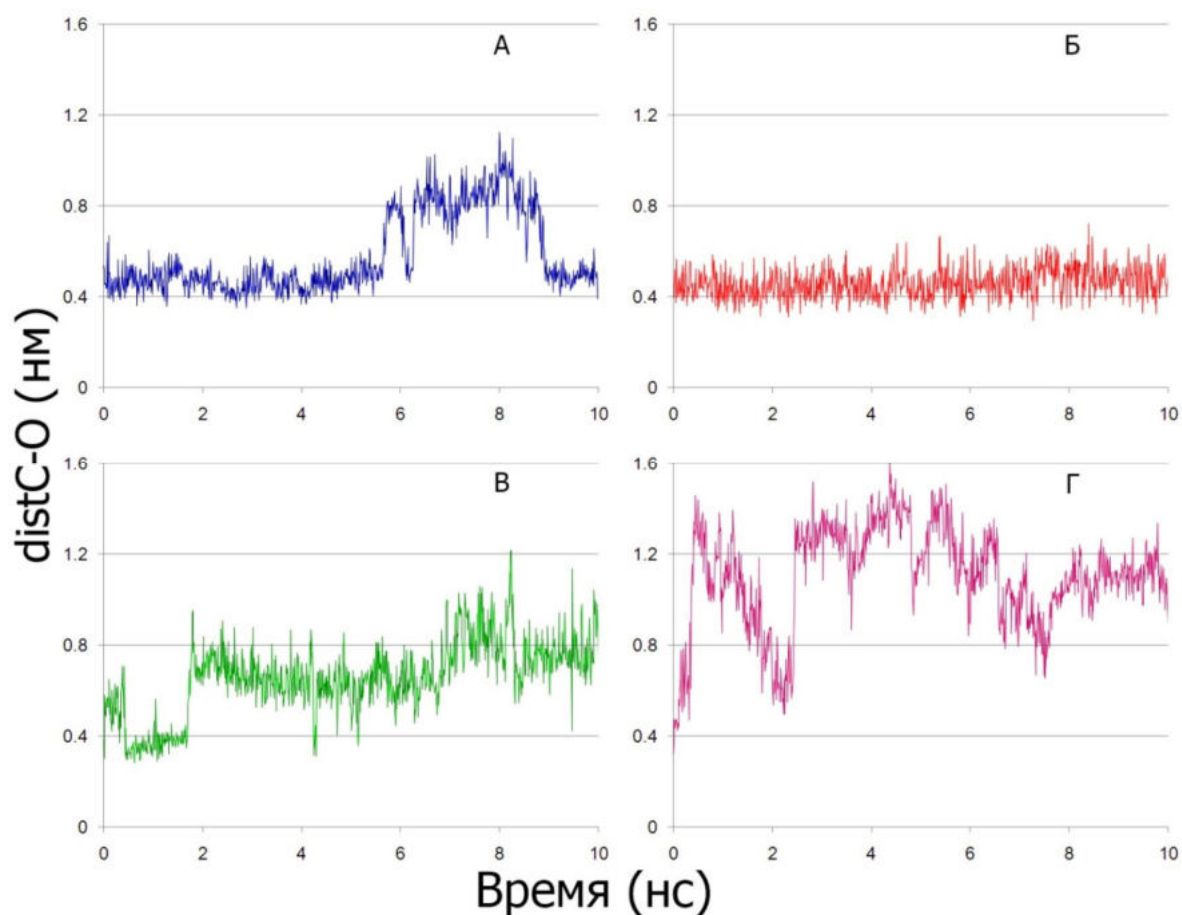
указывают на наличие у альбумина истинно эстеразной активности по отношению к НФА. Важно отметить, что активный выход ацетата наблюдается уже в первые минуты взаимодействия БСА с НФА, тогда как время полужизни ацетилированного Tyr411 составляет  $61 \pm 4$  часа (Lockridge et al., 2008). Что касается аддуктов ацетата с другими аминокислотными остатками альбумина, то только на их образование необходимо не менее 30 минут (Lockridge et al., 2008). Полученный результат подтверждает предположение о том, что в молекуле альбумина существует сайт истинной эстеразной активности, отличный от сайта Садлоу II.

На следующем этапе с помощью методов молекулярного моделирования мы попытались выявить этот сайт. Как уже было отмечено выше, 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 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.

Известны кристаллические структуры комплексов альбумина человека с варфарином в сайте Садлоу I (код структуры 2bxd) и 4Z,15E-bilirubin-I $\alpha$  в сайте III (код структуры 2vue). Анализ окружения этих лигандов выявил Tyr150 и Ser287 в сайте Садлоу I, а также Tyr138, Tyr161 и Ser193 в сайте III. Из этих аминокислот Ser287 и Tyr161 являются сайтами необратимого ацетилирования, тогда как аддукты с Tyr150, Tyr138 и Ser193 не были выявлены методом MALDI-TOF (Lockridge et al.,

2008). Эти три остатка и являются основными кандидатами на роль каталитических остатков, отвечающих за истинно эстеразную активность альбумина.

Аминокислотам Tyr138, Tyr150, Ser193 и Tyr411 в ЧСА соответствуют Tyr137, Tyr149, Ser192 и Tyr410 в БСА. На следующем этапе мы провели молекулярный докинг НФА в предполагаемые центры эстеразной активности БСА, а также в сайт псевдоэстеразной активности белка (Садлоу II). Поскольку ключевым фактором для возможности прохождения эстеразной реакции является в первую очередь геометрия продуктивного комплекса, из всех найденных конформаций комплекса белок-лиганд мы отбирали конформацию с минимальным расстоянием между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты ( $\text{distC-O}$ ). Для всех четырех исследуемых центров связывания была выявлена такая конформация НФА, в которой он находится в непосредственной близости от каталитической аминокислоты. На следующем этапе стабильность полученных комплексов была проверена методом молекулярной динамики. На данном этапе мы ограничились короткими траекториями длиной 10 нс. Зависимость значений  $\text{distC-O}$  от времени представлена на Рисунке 5. Согласно полученным данным лишь комплекс НФА с сайтом Садлоу II остается стабильным в течение 10 нс (Рисунок 5Б), 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.



**Рисунок 5.** Зависимость от времени расстояния между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты в сайте псевдоэстеразной активности и предполагаемых сайтах эстеразной активности альбумина быка (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.

Что касается сайта Садлоу I, согласно полученным данным, большую часть времени ориентация НФА относительно аминокислот сайта остаётся неизменной (Рисунок 5А). Исключение составил лишь небольшой период (с 6 по 9 нс), но затем молекула лиганда возвращается в исходную конформацию между аминокислотными остатками Tyr149 и His241.

В случае Tyr138 (Рисунок 5В), молекула НФА некоторое время остается в сайте, затем покидает его, и финальную часть симуляции взаимодействует с Lys187, одним из возможных сайтов необратимого ацетилирования. В случае Ser193 (Рисунок 5Г) молекула НФА сразу покидает сайт связывания и приближается к аминокислотному остатку

Lys431 на поверхности белка, который также является сайтом необратимого ацетилирования.

Таким образом, по всей видимости, Ser192 (Ser193 в ЧСА) не является основным сайтом эстеразной активности альбумина. В пользу этого предположения говорит тот факт, что в молекуле КСА Ser192(193) заменен на аланин, тогда как КСА и ЧСА показывают схожую кинетику гидролиза НФА – быстрый всплеск активности и затем переход в стационарный режим (Гончаров и др., 2017). В случае Tyr137 (Tyr138 в ЧСА) молекула НФА также быстро покидает активный центр, и мы полагаем, что эта аминокислота не принимает участие в эстеразной активности белка (по крайней мере, не является основным сайтом). В ближайшем окружении Tyr137 нет аминокислот, способных оттянуть на себя протон каталитического тирозина, в отличие от сайта Садлоу I, где поблизости от Tyr149 присутствуют His241 и His287 (His242 и His288 в ЧСА). В предыдущих исследованиях мы изучали кинетику выхода нитрофенола при взаимодействии альбуминов разных видов с НФА и показали, что варфарин (специфический лиганд сайта Садлоу I) ингибирует отдаленную стадию гидролиза НФА альбумином (Гончаров и др., 2017). 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 изменения степени окисления тиоловой группы Cys34 на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина.* В составе молекулы альбумина содержится свободная тиоловая группа в составе цистеина Cys34, которая способна образовывать дисульфиды со свободным цистеином и другими тиолами, или окисляться до сульфеновой и сульфиновой кислоты (Grigoryan et al., 2012). Альбумин, содержащий свободную сульфгидрильную группу в составе Cys34, называется меркаптоальбумином, а альбумин, модифицированный по остатку Cys34, –

немеркаптоальбумином. У здоровых людей около 70% альбумина находится в восстановленном состоянии (Di Simplicio et al., 2005). При патологических состояниях, таких как заболевания почек или печени, уровень окисленного альбумина может возрасти до 70% (Nagumo et al., 2014).

В плазме крови здорового человека около 80% всех тиолов приходится на остаток Cys34 альбумина (Turell et al., 2013). Он способен стехиометрически инактивировать пероксид водорода, пероксинитрит, супероксид-анион и хлорноватистую кислоту, окисляясь при этом до сульфеновой кислоты (ЧСА-SOH). При оксидативном стрессе Cys34 может образовывать дисульфид, взаимодействуя со свободным цистеином или глутатионом; окисление изменяет трехмерную структуру ЧСА и влияет на связывание многих ксенобиотиков (фармпрепаратов и токсических веществ). Аффинность к эндогенным лигандам билирубину и триптофану, а также к экзогенным фармпрепаратам варфарину и диазепаму снижается пропорционально уровню окисленного альбумина (цистеинилирование по Cys34) (Nagumo et al., 2014). Аффинность к липидам также различается: проатеросклеротические лизофосфатидилхолин и лизофосфатидная кислота имеют более высокое сродство к окисленной изоформе, тогда как антиатеросклеротические производные эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот обладают более высоким сродством к восстановленной изоформе альбумина (Kurano et al., 2019). Недавние исследования позволяют предполагать, что окисленные изоформы альбумина являются самостоятельным патогенетическим фактором многих распространенных и социально-значимых заболеваний, а их уровень тесно связан с характером питания человека (Tabata et al., 2021).

Влияние окисления альбумина на его связывающие и эстеразные свойства практически не изучалось, а в работах, посвященных этому вопросу, получены противоречивые данные. В представленной работе

биохимическими методами и методами молекулярного моделирования было изучено влияние степени окисления тиоловой группы Cys34 альбуминов человека и быка на их связывающую и гидролитическую активность.

На первом этапе было проведено сравнение функциональных характеристик коммерческого БСА (частично окисленного) и восстановленного БСА по отношению к НФА. Эксперимент по определению количества тиоловых групп на молекулу белка показал, что в коммерческом БСА на одну молекулу белка приходится 0.42 свободных тиоловых группы, то есть 58% альбумина в образце находится в окисленном состоянии, а 42% - в восстановленном. После инкубации раствора БСА с восстановителем ДТТ в соотношении 1:3 количество свободных групп на молекулу составило 1.27, что означает, что в полученной фракции БСА все молекулы альбумина находятся в восстановленном состоянии. Возникновение дополнительных 0.27 частей свободных тиоловых групп, по всей видимости, связано с невозможностью полностью отфильтровать ДТТ после восстановления тиоловой группы Cys34.

Кинетические характеристики коммерческого и восстановленного БСА приведены в Таблице 1. Согласно полученным экспериментальным данным, 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, субстрат более прочно связывается с белком, но при этом не гидролизуется, что означает замедление истинно эстеразной активности в сайте Садлоу I.

**Таблица 1.** Кинетические характеристики восстановленного и коммерческого БСА.

образец	1 стадия (сайт Садлоу II)		2 стадия (сайт Садлоу I)	
	$K_m$ , мкМ	$V_{max}$	$K_m$ , мкМ	$V_{max}$
БСА восстан.	75.8±10.2	2.8±0.1	362.6±70.7	5.3±0.7
БСА коммер.	140.5±29.7	2.3±0.2	195.3±35.7	2.1±0.2

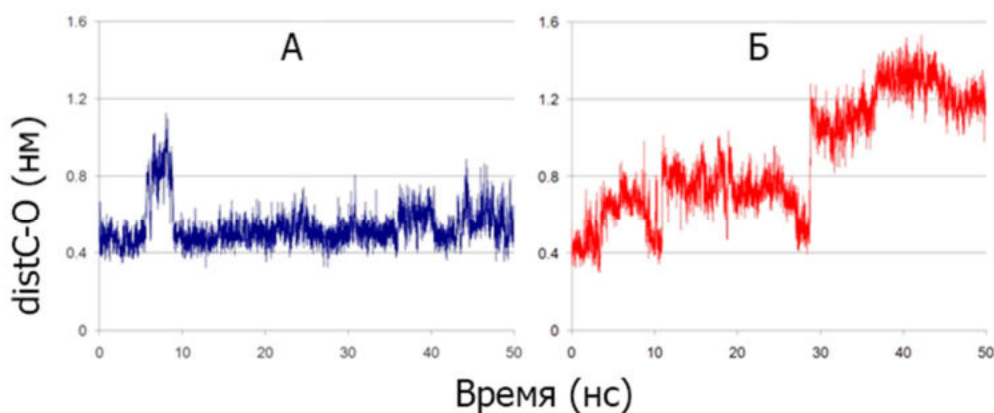
На следующем этапе взаимодействие НФА с БСА с разной степенью окисления было изучено методами молекулярного моделирования. В качестве трёхмерной модели восстановленного БСА (БСА-Cys34-SH, мБСА) использовали данные рентгеноструктурного анализа из базы данных белковых структур (Protein Data Bank), код структуры 4jk4. Согласно имеющимся данным (Ikegaya et al., 2010), цистеинилированный альбумин является мажорной формой окисленного белка, поэтому в нашем исследовании мы изучили взаимодействие цистеинилированного БСА (cysБСА) с НФА.

Подготовленные 3d-модели НФА и восстановленного БСА (меркаптоальбумин, мБСА) использовали для процедуры молекулярного докинга НФА в сайты Садлоу I и Садлоу II. Поскольку структуры сайтов Садлоу I и Садлоу II в подготовленных моделях мБСА и cysБСА идентичны (изменения в структуре затронули лишь Cys34 и его окружение), отдельно молекулярный докинг НФА в cysБСА не проводили. Для молекулярной динамики комплекса cysБСА с НФА использовали те же стартовые координаты лиганда, которые были получены в результате молекулярного докинга НФА в сайты Садлоу восстановленного БСА. Конформационные изменения полученных комплексов БСА-НФА были рассчитаны методом молекулярной динамики. По полученным траекториям была построена зависимость значения расстояния между

карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитической аминокислоты (distC-O) от времени (Рисунки 6 и 7).

Согласно полученным данным, ориентация НФА относительно аминокислот сайта Садлоу I мБСА остаётся практически неизменной. Исключение составил лишь небольшой период (с 7 по 10 нс, Рисунок 6А). В промежутке 10-15 нс конформация НФА в сайте Садлоу I мБСА максимально стабильна, значение distC-O при этом минимально. Молекула НФА остаётся «зажатой» аминокислотными остатками Tyr149 и His241.

В случае cysБСА, 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.

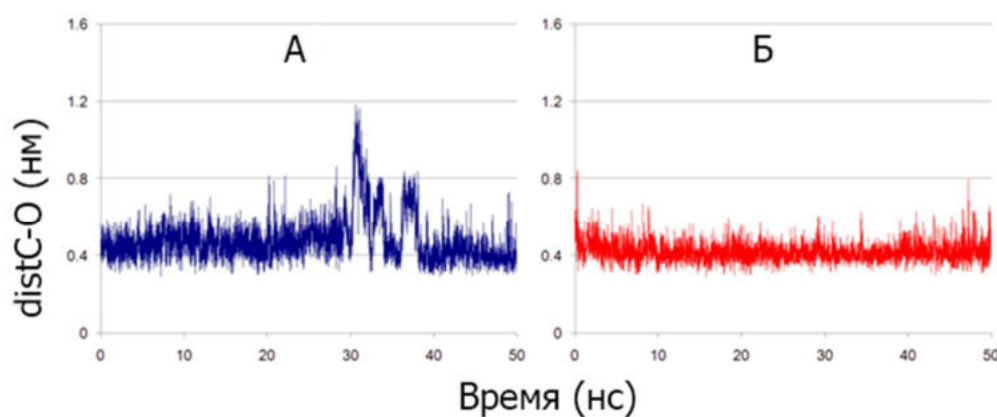


**Рисунок 6.** Зависимость от времени величины distC-O – расстояния между атомом карбонильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода Tyr149 в нативном (А) и цистеинилированном (Б) альбумине быка.

Зависимость distC-O от времени для сайта Садлоу II представлена на Рисунке 7. Согласно полученным данным, молекула НФА может находиться в сайте Садлоу II мБСА в двух конформациях (промежутки 0-25 нс и 40-50 нс), а в промежутке 30-40 нс происходит конформационный переход. Конформации различаются положением нитрогруппы. В первой конформации нитрогруппа взаимодействует с имидазольным кольцом



His463 и остовом остатков Leu422 и Val455. Во второй конформации NO<sub>2</sub>-группа расположена вблизи остова остатков Ile387 и Leu386 и бокового радикала Asn390. В обеих конформациях значение distC-O колеблется в районе 0.4 нм.



**Рисунок 7.** Зависимость от времени величины distC-O – расстояния между атомом карбонильного углерода НФА и атомом гидроксильного кислорода Tyr410 в нативном (А) и цистеинилированном (В) альбумине быка.

В случае cysБСА, молекула НФА остается в одной конформации на протяжении всей траектории, нитрогруппа лиганда при этом взаимодействует с имидазольным кольцом His463 и остовом остатков Leu422 и Val455.

Мы полагаем, что стабильность продуктивных комплексов отражает значение  $V_{\max}$ : чем стабильнее продуктивная конформация и меньше значение distC-O, тем быстрее происходит реакция. В этом ключе данные молекулярного моделирования согласуются с данными Таблицы 1. Согласно экспериментальным данным, скорость гидролиза в сайте Садлоу II практически одинаковая для коммерческого (частично окисленного) и восстановленного БСА. Аналогично, по данным молекулярной динамики, продуктивность комплекса НФА с сайтом Садлоу II БСА существенно не меняется после цистеинилирования Cys34. В случае отдаленной фазы (кинетика сайта Садлоу I), коммерческий альбумин медленнее гидролизует НФА. Аналогично, продуктивный комплекс cysБСА с НФА в сайте Садлоу I менее стабилен по сравнению с нативным белком.

Оценочные значения свободных энергий  $\Delta G$  образования комплексов НФА с сайтами Садлоу БСА с разной степенью окисления представлены в Таблице 2. Значение  $\Delta G$  связано с константой диссоциации  $K_s$  формулой (1):

$$K_s = \exp (\Delta G / (R \times T)) \quad (1),$$

где  $R$  – это газовая постоянная,  $T$  – температура, а  $K_s$  в свою очередь представляет собой отношение константы  $k_{-1}$  к константе  $k_1$  (Схема 1).

**Таблица 2.** Оценочные значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов НФА с сайтами Садлоу БСА с разной степенью окисления. мБСА — нативный альбумин, cysБСА — цистеинилированный альбумин.

	Садлоу I	Садлоу II
мБСА	-17.5±2.0	-22.4±1.8
cysБСА	-16.7±2.9	-22.1±1.6

Согласно полученным данным, цистеинилирование БСА практически не влияет на сродство сайтов Садлоу к НФА, что не согласуется с экспериментальными данными по значениям  $K_m$  (Таблица 1). Такое несоответствие можно объяснить тем, что значения  $\Delta G$  отображает константу диссоциации  $K_s = k_{-1}/k_1$ , тогда как константа  $K_m$  зависит еще от значения  $k_2$ . Также, не исключено, что коммерческий альбумин может быть окислен неоднородно. В нашей работе мы смоделировали только цистеинилированный альбумин, тогда как в условиях *in vitro* тиоловая группа Cys34 может просто окисляться при длительном хранении в сухом виде или вскоре после приготовления раствора до сульфеновой (Cys34-SOH) или сульффиновой (Cys34-S(O)O<sup>-</sup>) кислоты.

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 ЧСА и БСА и разной занятости сайтов Садлоу I и Садлоу II параоксоном (Таблица 3).

**Таблица 3.** Условные обозначения трёхмерных моделей альбуминов человека (ЧСА) и быка (БСА) в зависимости от степени окисления тиоловой группы Cys34 и занятости сайтов Садлоу I и Садлоу II параоксоном.

<b>ЧСА</b>		
	<b>Параоксон в сайте Садлоу I</b>	<b>Параоксон в сайте Садлоу II</b>
<b>Cys34-SH</b>	ЧСА0-I	ЧСА0-II
<b>Cys34-SOH</b>	ЧСА1-I	ЧСА1-II
<b>Cys34-SOO<sup>-</sup></b>	ЧСА2-I	ЧСА2-II
<b>БСА</b>		
	<b>Параоксон в сайте Садлоу I</b>	<b>Параоксон в сайте Садлоу II</b>
<b>Cys34-SH</b>	БСА0-I	БСА0-II
<b>Cys34-SOH</b>	БСА1-I	БСА1-II
<b>Cys34-SOO<sup>-</sup></b>	БСА2-I	БСА2-II

Модели ЧСА0-I, ЧСА0-II, БСА0-I и БСА0-II соответствует неокисленной форме цистеина Cys34. Константа диссоциации кислоты бокового радикала цистеина в логарифмической шкале (pKa) составляет примерно 8.5 (Poole, 2015), поэтому в диапазоне физиологических значений pH (7.2-7.4) атом серы будет преимущественно протонирован: Cys34-SH.

Модели ЧСА1-I, ЧСА1-II, БСА1-I и БСА1-II соответствует первой стадии окисления цистеина – сульфеновой кислоте. Показано, что pKa сульфеновых кислот превышает 10 (Ali et al., 2010). Согласно этому значению, гидроксильная группа сульфеновой кислоты Cys34 при

нейтральных значениях pH будет протонированной: Cys34-SOH. Вторая стадия окисления цистеина – сульфоновая кислота (модели ЧСА2-I, ЧСА2-II, БСА2-I и БСА2-II). Благодаря низкому значению pKa (около 2) (Ali et al., 2010), в диапазоне физиологических значений pH сульфоновая кислота будет преимущественно депротонирована: Cys34-S(O)O<sup>-</sup>. Теоретически боковой радикал цистеина может необратимо окисляться и до сульфоновой кислоты (Cys34-S(O)O<sup>-</sup> O<sup>-</sup>). Однако, согласно литературным данным, процентное содержание Cys34 в виде сульфоновой кислоты в плазме крови крайне мало (Grigoryan et al., 2012), поэтому эту степень окисления мы не рассматривали.

Согласно полученным данным (Таблица 4), 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. Влияние редокс-статуса Cys34 на взаимодействие альбумина с ФОС и межвидовые различия следует учитывать при анализе данных экспериментов *in vivo* и *in vitro* с альбумином.

Принципиальное отличие между НФА и параоксоном при взаимодействии с БСА состоит в том, что в случае восстановленного белка НФА остается внутри сайта Садлоу I, тогда как параоксон сразу отдалается от каталитического тирозина Tyr149. Согласно данным работы (Гончаров и др., 2017) варфарин (специфический ингибитор сайта Садлоу I) ингибировал гидролиз НФА в сайте Садлоу I ЧСА, БСА и КСА, но не

оказывал влияния на гидролиз параоксона в этом сайте. По всей видимости, механизмы истинной эстеразной активности альбумина по отношению к НФА и параоксону различны. Другое немаловажное отличие между НФА и параоксином заключается в том, что, согласно расчетным данным, сродство сайта Садлоу I БСА по отношению к параоксону повышается с увеличением степени окисления белка, тогда как окисление (цистеинилирование) БСА не влияет на сродство сайта к НФА, что опять же согласуется с предположением о разных механизмах реакции.

**Таблица 4.** Оценочные значения свободных энергий  $\Delta G$  (ккал/моль) образования комплексов альбуминов человека (ЧСА) и быка (БСА) с параоксином в сайтах Садлоу I и Садлоу II.

Сайт	Альбумин	Cys34-SH	Cys34-SOH	Cys34-S(O)O <sup>-</sup>
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

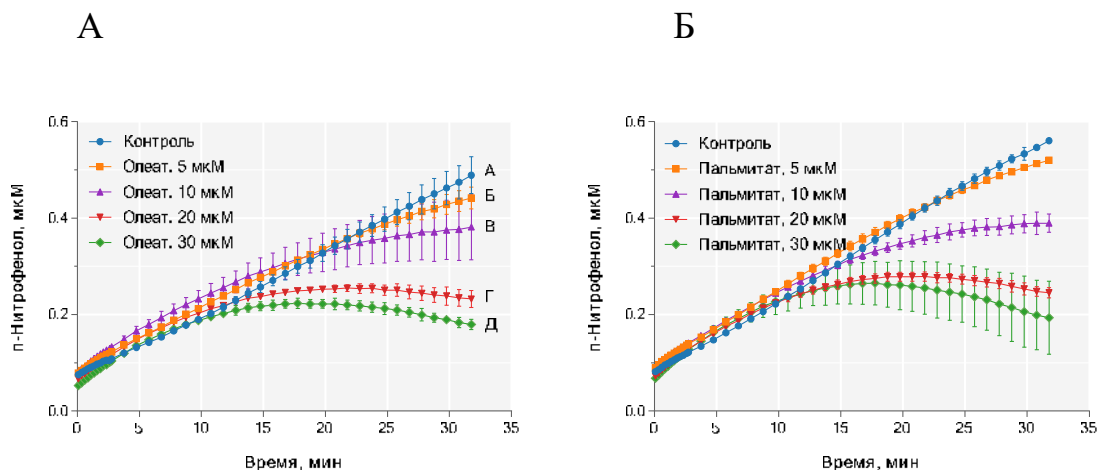
Другое возможное объяснение ряда несогласованностей состоит в том, что существенную роль может играть не только субстрат, но и характер окисления Cys34. Так, согласно экспериментальным данным, при взаимодействии НФА с БСА  $K_m$  для отдаленной стадии гидролиза (сайт Садлоу I) ниже у коммерческого (частично окисленного) БСА по сравнению с восстановленным белком, то есть у сайта Садлоу I окисленного БСА сродство к НФА выше. Аналогичный результат получился в экспериментах *in silico* по взаимодействию БСА с параоксином: сродство сайта Садлоу I БСА к параоксону выше для белка, окисленного до сульфеновой и сульфинозой кислоты. Дополнительные

эксперименты с гомогенным окислением БСА пероксидом водорода и цистином помогут подтвердить или опровергнуть эту гипотезу.

*Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина.* Жирные кислоты (ЖК): олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и линолевая – присутствуют в составе крови в значительном количестве: в норме концентрация каждой из них составляет десятки или даже сотни мкМ. Альбумин является основным переносчиком ЖК по кровеносному руслу. Методом рентгеноструктурного анализа (РСА) было показано, что в молекуле альбумина существует семь сайтов связывания ЖК: FA1 (возле Ala158), FA2 (возле Leu22), FA3 (возле Asn391), FA4 (возле Tyr411), FA5 (возле Ala528), FA6 (возле Ala213), FA7 (возле Tyr150) (Van der Vusse, 2009). Окружение сайта FA4 соответствует сайту Садлоу II, а сайта FA7 - сайту Садлоу I. Согласно литературным данным, олеиновая кислота обладает максимальным сродством к сайту FA5, и чуть меньшим сродством к сайту FA2 (Rizzuti et al., 2015). В ряде работ показано влияние ЖК на сродство СА к различным лигандам (Dasgupta, Crossey, 1997; Vorum, Honore, 1996).

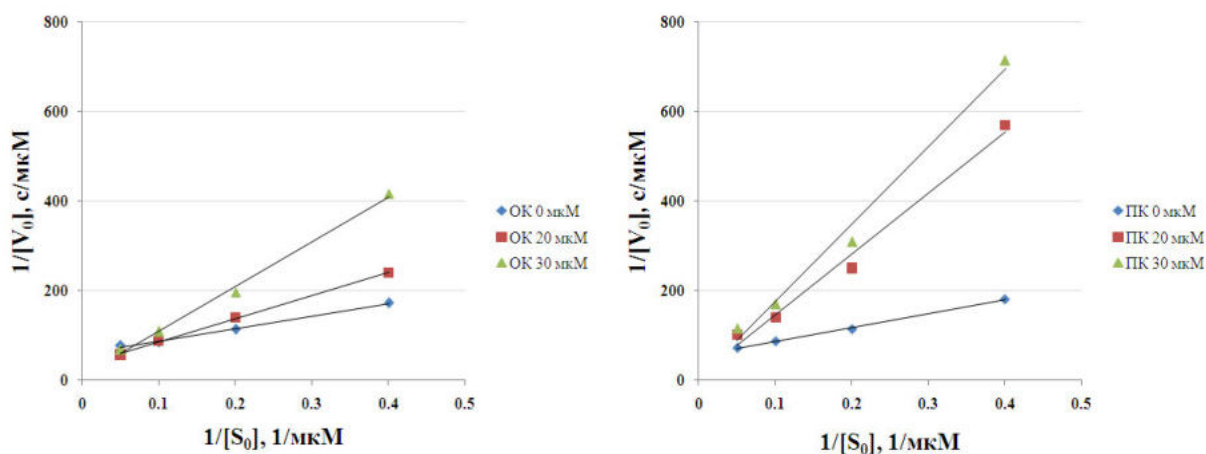
В представленной работе мы изучили влияние олеиновой и пальмитиновой кислоты на кинетику (псевдо)эстеразной активности БСА, ЧСА и КСА. На рисунке 8 показаны зависимости концентрации продукта гидролиза НФА альбумином п-нитрофенола от времени при разной концентрации ОК и ПК в растворе и при исходной концентрации НФА равной 60 мкМ. ОК и ПК оказывают на БСА действие, схожее с выявленным ранее у ибупрофена и варфарина (Гончаров и др., 2017). Скорость реакции экспоненциально замедляется, и наступает состояние равновесия. Согласно полученным данным, жирные кислоты 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. Наиболее заметное ингибирование гидролиза наблюдается при наибольших концентрациях ЖК (20 и 30 мкМ).



**Рисунок 8.** Расщепление НФА с высвобождением *p*-нитрофенола, катализируемое альбумином в присутствии олеиновой (А) и пальмитиновой (Б) кислоты.

На рисунке 9 представлена зависимость начальной скорости гидролиза НФА альбумином  $V_0$  от исходной концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка в отсутствие и в присутствии ОК и ПК в растворе.



**Рисунок 9.** Скорость гидролиза НФА альбумином быка в отсутствие и в присутствии олеиновой (ОК, слева) и пальмитиновой кислоты (ПК, справа) в координатах Лайнуивера-Берка.

Константа скорости ингибирования эстеразной реакции  $k_{obs}$  олеиновой кислотой в концентрациях 20 и 30 мкМ равна, соответственно,  $2.37 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  и  $3.19 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Значения этой константы для пальмитиновой

кислоты составили  $2.50 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  и  $3.64 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  для 20 и 30 мкМ, соответственно.

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 крысиного альбумина оказалась в 5 раз ниже, чем у альбумина человека (Таблица 5). При этом не было выявлено эффекта ингибирования эстеразной реакции в сайте Садлоу I. Полученный результат может быть связан с тем, что ЧСА обладает более высокой пластичностью и гибкостью в растворе при взаимодействии с ЖК по сравнению с БСА (Reichenwallner, Hinderberger, 2013).

**Таблица 5.** Кинетические характеристики ингибирующего влияния олеиновой кислоты ( $K_i$ , мкМ) на сайты Садлоу человеческого и крысиного альбумина при использовании п-нитрофенилацетата (НФА) в качестве субстрата.

	<b>ЧСА</b>	<b>КСА</b>
Садлоу I	не ингибирует	не ингибирует
Садлоу II	$16313.1 \pm 626.1$	$3390.4 \pm 456.7$

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 (Гончаров и др., 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 олеиновой кислоты в сайте FA5 или



FA2. Эффективность взаимодействия параоксона с альбумином оценивали по двум параметрам: (1) зависимость от времени значения расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитического тирозина (Tu150 для сайта Садлоу I и Tyr411 для сайта Садлоу II) (distP-O) и (2) оценочные значения свободных энергий ( $\Delta G$ ) образования исследуемых комплексов альбумина с параоксоном (Таблица 6).

**Таблица 6.** Оценочные значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов альбумина с параоксоном в отсутствие и присутствии олеиновой кислоты и продуктивность этих комплексов. (+) - комплекс продуктивен, (-) - комплекс не продуктивен.

параоксон	Олеиновая кислота		
	отсутствует	в сайте FA5	в сайте FA2
в сайте Садлоу I	-20.8±2.5 / (-)	-21.8±2.8 / (-)	-17.7±2.4 / (-)
в сайте Садлоу II	-25.2±2.8 / (+)	-23.0±2.9 / (+)	-24.9±2.6 / (-)

Олеиновая кислота в реальных условиях будет связываться и в сайте FA5, и в сайте FA2. Поэтому можно ожидать, что повышенная концентрация жирных кислот в крови, даже без учета конкуренции за связывание с сайтами Садлоу I (он же FA7) и Садлоу II (он же сайт FA3/4), будет оказывать (или не оказывать) следующее влияние на эстеразную и связывающую активность альбумина человека:

- не влиять на эстеразную реакцию в сайте Садлоу I
- уменьшать вероятность псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II
- уменьшать связывающую активность ЧСА по отношению к параоксону в сайте Садлоу I

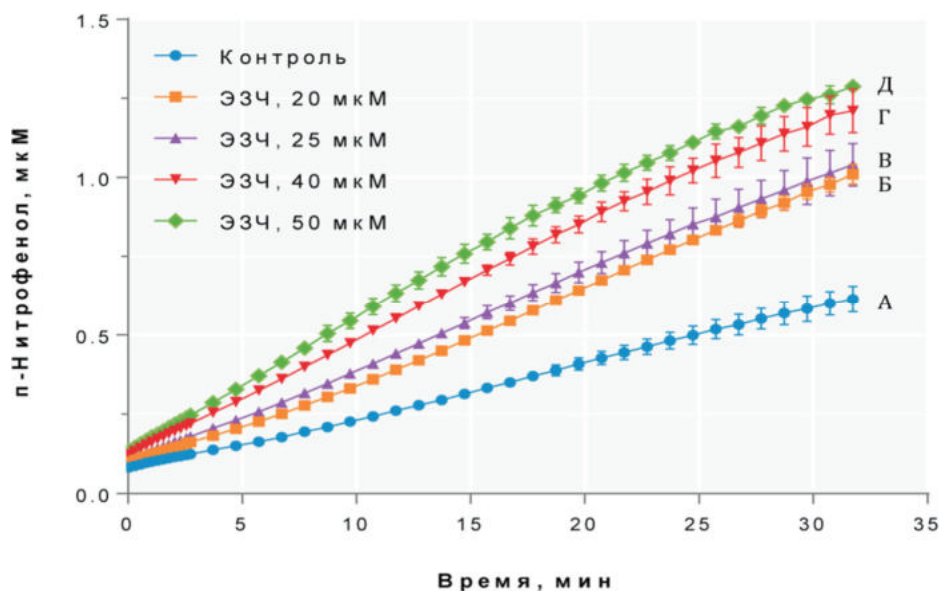
- уменьшать связывающую активность ЧСА по отношению к параоксону в сайте Садлоу II

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.* В поисках вспомогательных средств терапии отравлений в последнее время стали уделять внимание нутрицевтикам (Chauhan et al., 2013), преимущество которых заключается в доступности, дешевизне, а самое главное – довольно высокой эффективности по отношению к оставленным эффектам отравлений при практически полном отсутствии побочных эффектов. В экспериментах с ФОС установлены превентивные эффекты омега-3-полиненасыщенных жирных кислот, экстракта корня имбиря *Zingiber officinale*, полифенолов *Parquetina nigrescens* из семейства Кутровых, полифенолов зеленого чая *Camellia sinensis* (декофеинизированный экстракт зеленого чая, ЭЗЧ) (Гончаров и др., 2019а). Полифенолы способны связываться с альбумином (Latruffe et al., 2014), поэтому их возможное влияние на связывающие и эстеразные свойства белка представляет особый интерес. В представленной работе биохимическими методами было изучено влияние ЭЗЧ на связывающую и эстеразную активность БСА по отношению к модельному соединению *n*-нитрофенилацетату (НФА) и фосфорорганическому соединению параоксону.

ЭЗЧ представляет собой смесь полифенолов, среди которых важнейшим и преобладающим является эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГКГ). Известно, что полифенолы зеленого чая являются лигандами сразу обоих сайтов Садлоу. При этом они способны конкурировать с

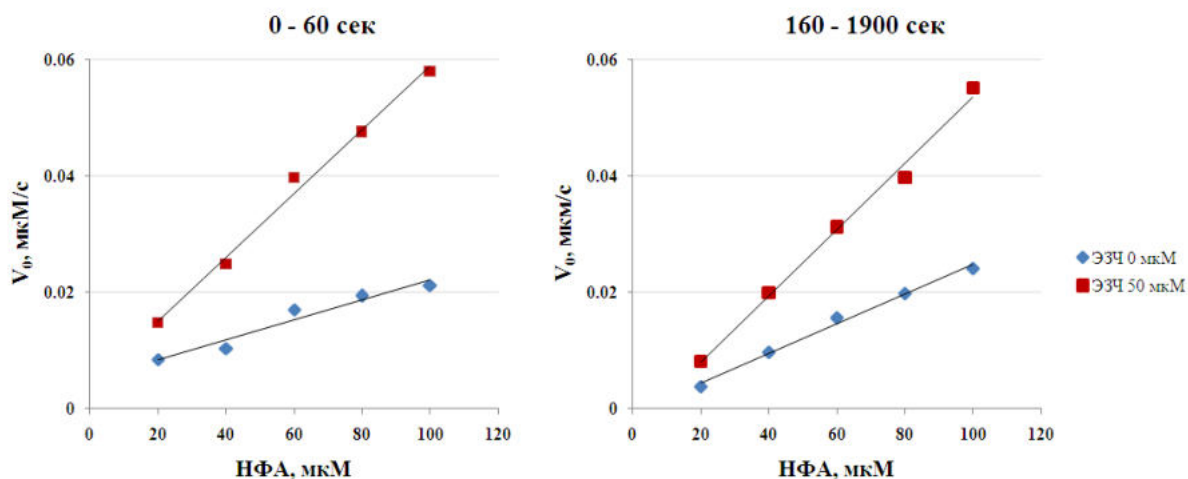
высокоспецифичными соединениями за связывание с этими сайтами (Eaton, Williamson, 2017). Анализ данных, полученных при инкубировании БСА с НФА в присутствии ЭЗЧ, выявил активирующее влияние ЭЗЧ на скорость гидролиза НФА альбумином (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Гидролиз п-нитрофенилацетата (НФА) с высвобождением п-нитрофенола, катализируемое БСА в присутствии декофеинизированного ЭЗЧ. Концентрация альбумина (E) составляла 10 мкМ, а НФА (S) – 80 мкМ. А – контроль, без добавления экстракта зеленого чая (ЭЗЧ); Б, В, Г, Д – концентрация ЭЗЧ 20, 25, 40, 50 мкМ, соответственно.

На рисунке 11 представлена зависимость начальной скорости гидролиза НФА альбумином  $V_0$  от исходной концентрации субстрата в отсутствие и в присутствии ЭЗЧ в растворе. По полученным концентрационным зависимостям были вычислены кинетические параметры эстеразной реакции в сайте Садлоу I и псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II (Таблицы 7 и 8). Анализ полученных данных показал, что полифенолы зеленого чая снижают кажущуюся константу Михаэлиса  $K_m^{app}$  в 1.9 раза (при концентрации ЭЗЧ 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 таким образом повышается в 2.7 раз по сравнению с контролем. Влияние экстракта зеленого чая 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.



**Рисунок 11.** Скорость гидролиза НФА бычьим альбумином в отсутствие и в присутствии ЭЗЧ в начальный (слева) и отдаленный (справа) периоды.

**Таблица 7.** Кинетические параметры эстеразной реакции в сайте Садлоу I БСА к НФА в контроле и после добавления ЭЗЧ.

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу I		
	Стационарный режим		
	$K_m^{app}$ , мкМ	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m^{app} \times 10^{-6}$ , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
БСА + НФА	$20.7 \pm 1.5$	$0.0051 \pm 0.0004$	$246.4 \pm 19.3$
БСА + НФА + ЭЗЧ 50 мкМ	$10.7 \pm 0.1^{**}$	$0.0072 \pm 0.0003^*$	$672.9 \pm 28.0$

\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

**Таблица 8.** Кинетические параметры псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II БСА по отношению к НФА в контроле и после добавления ЭЗЧ.

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу II			
	Предстационарный режим			
	$K_m^{app}$ , мкМ	$K_s$ , мкМ	$k_2$ , с <sup>-1</sup>	$k_2/K_m^{app}$ , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
БСА + НФА	$3.44 \pm 0.37$	$0.22 \pm 0.07$	$0.44 \pm 0.01$	$0.14 \pm 0.02$
БСА + НФА + ЭЗЧ 50 мкМ	$2.91 \pm 0.01$	$1.21 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.01$

Действие ЭЗЧ на скорость гидролиза параоксона бычьим альбумином оказалось схожим с НФА: активность обоих сайтов альбумина значительно усиливалась (Таблица 9).

Анализ полученных значений позволяет сказать, что полифенолы зеленого чая в 20 раз повышают сродство сайта Садлоу I альбумина к параоксону на фоне снижения каталитической константы  $k_3$  в 6 раз. Тем не менее, такое значительное повышение сродства альбумина к субстрату компенсирует снижение константы  $k_3$  (каталитическая эффективность увеличивается в 3.5 раз) и объясняет прирост в скорости реакции. Влияние, оказываемое полифенолами зеленого чая на активность сайта Садлоу II по отношению к параоксону, выражается в снижении субстратной константы  $K_s$  в 3 раза по сравнению с контролем. По всей видимости, это связано с увеличением константы прямой реакции  $k_1$  и/или снижением константы обратной реакции  $k_{-1}$ .

**Таблица 9.** Кинетические параметры параоксоназной и псевдоэстеразной реакции в сайтах альбумина Садлоу I и II в контроле и после добавления ЭЗЧ.

Фермент и субстрат	Сайт Садлоу I			
	Стационарный режим			
	$K_m^{app}$	$k_3$	$k_3/K_m^{app}$	
	мкМ	$\times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$	$\times 10^{-6} \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$	
БСА + НФА	$197.0 \pm 20.6$	$0.89 \pm 0.05$	$4.5 \pm 0.3$	
БСА + НФА + ЭЗЧ 50 мкМ	$9.6 \pm 1.8$	$0.15 \pm 0.01$	$15.6 \pm 1.0$	
	Сайт Садлоу II			
	Предстационарный режим			
	$K_m^{app}$	$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$	$k_2$	$\frac{k_2}{K_m^{app}}$
	мкМ		$\text{с}^{-1}$	$\text{мМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
БСА + НФА	$1.63 \pm 0.47$	$0.64 \pm 0.04$	$0.49 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.08$
БСА + НФА + ЭЗЧ 50 мкМ	$1.30 \pm 0.05$	$0.18 \pm 0.11$	$0.45 \pm 0.01$	$0.35 \pm 0.02$

Методами *in silico* нами было изучено влияние на примере транс-резвератрола на связывание параоксона с альбумином человека (ЧСА) и крысы (КСА). Основной причиной, почему резвератрол был отобран в качестве модельного полифенола для расчетных экспериментов, является то, что в плазме крови он связывается с альбумином лучше других полифенолов (Latruffe et al., 2014), а благодаря небольшим размерам и простой структуре с лучшей точностью описывается математически по сравнению с ЭГКГ. Выбор ЧСА и КСА для нашего исследования обусловлен тем, что эксперименты *in vivo* проводятся преимущественно на грызунах (Гончаров и др., 2019б). Очевидно, что экстраполяция на организм человека данных, полученных на крысах, не будет корректной

без проведения сравнительного анализа влияния любых модуляторов активности (в частности резвератрола) на ЧСА и КСА. Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики мы количественно оценили влияние связывания резвератрола в сайте Садлоу I на геометрию и эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II ЧСА и КСА. Были рассчитаны временные зависимости величины расстояния между атомом кислорода каталитического тирозина (Tyr411) и атомом фосфора параоксона. Согласно полученным данным, добавление молекулы резвератрола к комплексу ЧСА-параоксон существенно не влияет на поведение молекулы параоксона в сайте Садлоу II. Как и в случае комплекса ЧСА-параоксон без резвератрола, молекула не достигает полностью стабильного положения внутри сайта связывания, и временные промежутки, на которых значение расстояния O-P колеблется в районе 0.40 нм (при этом условии возможно образование ковалентной связи между лигандом и белком), чередуется со временными промежутками на которых молекула параоксона отдаляется от каталитического тирозина. В отличие от комплекса ЧСА-параоксон, комплекс КСА-параоксон оказывается более восприимчивым к добавлению резвератрола: поведение молекулы параоксона в сайте Садлоу II существенно меняется. Молекула параоксона отдаляется от остатка Tyr411 уже на предварительной стадии релаксации системы, и затем значение расстояния O-P не опускается ниже 0.48 нм, за исключением точечных осцилляций. При таком положении молекулы параоксона относительно каталитического Tyr411 невозможна реакция фосфорилирования тирозина. Т.е. присутствие молекулы резвератрола в сайте Садлоу I уменьшает вероятность реакции фосфорилирования в сайте Садлоу II КСА. Нами были рассчитаны энергии образования комплексов альбумин-параоксон в присутствии и в отсутствие резвератрола. Сравнение полученных значений позволило сделать вывод, что резвератрол существенно не влияет на эффективность связывания параоксона в сайте Садлоу II. Таким образом, влияние

резвератрола сводится лишь к уменьшению псевдэстеразной 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 травоядного 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, как ЭГКГ. Полученный результат частично объясняет некоторый защитный эффект ЭЗЧ при отравлении ФОС (Гончаров и др., 2019б), 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 *n*-нитрофенилацетата (НФА).* Диазепам и другие бензодиазепины применяют для 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  $73.5 \pm 21.4$  и  $169.9 \pm 48.7$  мкМ для сайтов Садлоу II и Садлоу I, соответственно (Таблица 10). Параметр  $\alpha$  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.

**Таблица 10.** Кинетические характеристики влияния диазепама на гидролиз *n*-нитрофенилацетата.

	Предстаационарный режим (Сайт Садлоу II)	Стационарный режим (Сайт Садлоу I)
$V_{max}$ , мкМ/мин	$3.0 \pm 0.6$	$2.7 \pm 0.4$
$\alpha$ , мкМ <sup>-1</sup>	$\sim 4,128e+102$	$\sim 9,752e+117$
$K_i$ , мкМ	$73.5 \pm 21.4$	$169.9 \pm 48.7$
$K_m$ , мкМ	$228.3 \pm 88.8$	$265.9 \pm 117.7$
$R^2$	0,8393	0,9011

При исследовании влияния карбоксима на (псевдо)эстеразную активность альбумина не было обнаружено снижения скорости гидролиза НФА. Напротив, 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. Значения кинетических характеристик представлены в таблицах 11 и 12.

**Таблица 11.** Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для первой стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (предстационарное состояние, 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 12.** Результаты расчета констант Михаэлиса-Ментен для второй стадии реакции гидролиза НФА при взаимодействии карбоксима с БСА (стационарное состояние, 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

Механизм этого явления и роль альбумина в терапевтическом эффекте реактиваторов при отравлении ФОС требует дальнейшего изучения.

Известно, что диазепам связывается с альбумином в сайте Садлоу II, проведен рентгеноструктурный анализ (РСА) комплекса альбумина

человека с диазепамом (Ghuman et al., 2005). Однако межвидовые различия взаимодействия диазепама с альбумином не изучались, анализ влияния диазепама на связывающие и эстеразные свойства альбумина по отношению к ФОС не проводился. Цель вычислительных экспериментов, представленных в этом разделе, – изучить влияние диазепама на связывающую и эстеразную активность альбумина человека (ЧСА) и крысы (КСА) методами молекулярного моделирования.

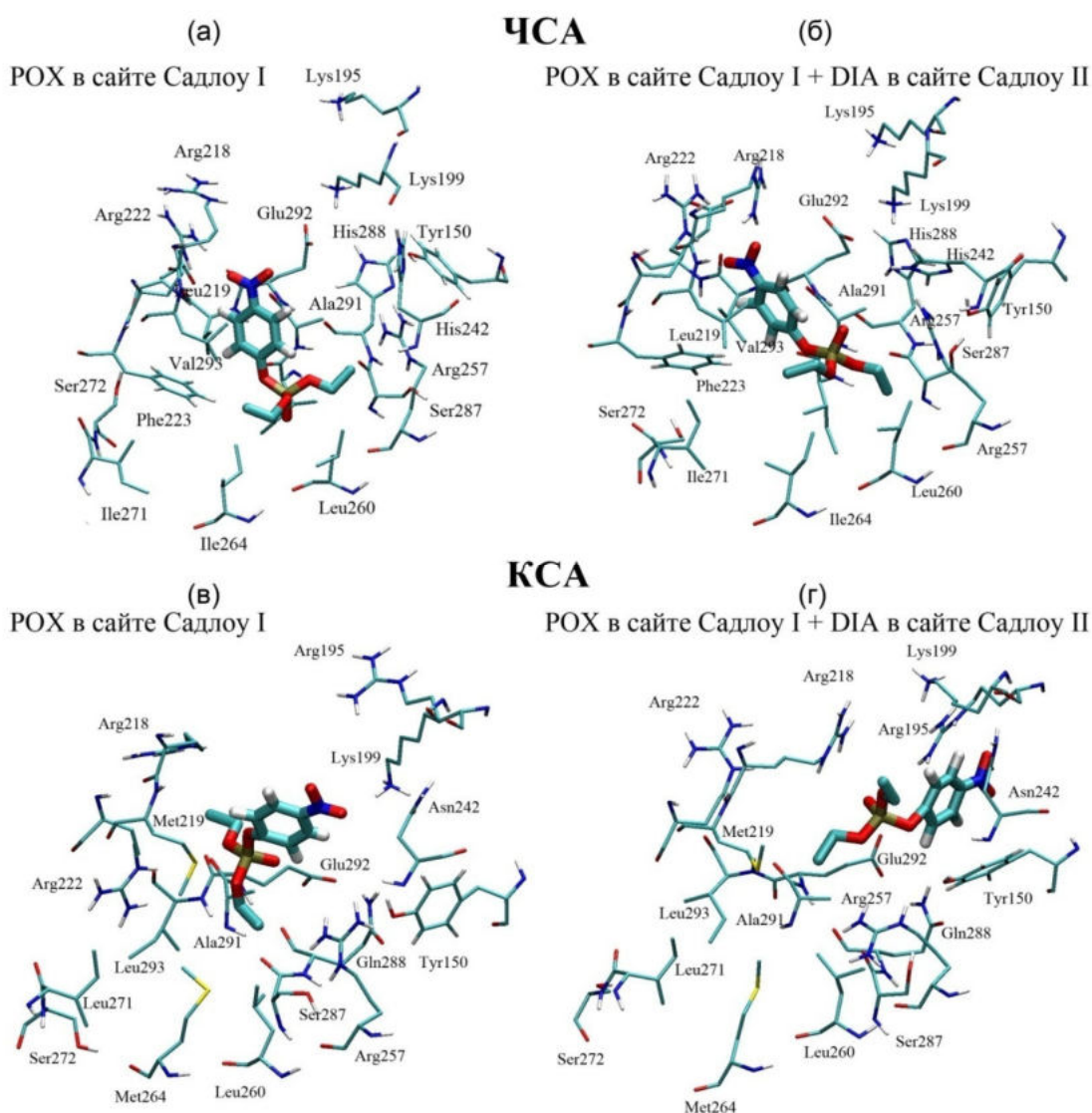
Методом молекулярного докинга с помощью программы Autodock Vina были получены одинарные и двойные комплексы ЧСА и КСА с параоксоном в сайте Садлоу I и диазепамом в сайте Садлоу II: ЧСА-параоксон, КСА-параоксон, ЧСА-диазепам, КСА-диазепам, ЧСА-параоксон-диазепам, КСА-параоксон-диазепам. На следующем этапе конформационные изменения комплексов были изучены методом молекулярной динамики. Прежде всего, нас интересовало положение молекулы параоксона относительно каталитического тирозина Tyr150, а именно расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr150 ( $distP-O$ ). Этот параметр важен для оценки продуктивности полученного белок-лигандного комплекса. Для образования новой ковалентной связи значение  $distP-O$  не должно превышать 0.4 нм. Конформация, в которой значение  $distP-O$  меньше 0.4 нм, называется продуктивной.

В отсутствие диазепама продуктивные комплексы альбумина с параоксоном в сайте Садлоу I не стабильны, параоксон за первые несколько пикосекунд удаляется от каталитического тирозина, и затем, на протяжении всего периода симуляции значение  $distP-O$  превышает необходимые для реакции 0.4 нм. Диазепам не повлиял на стабильность продуктивного комплекса альбумина человека с параоксоном: значение  $distP-O$  почти сразу возросло 0.8 нм и далее не уменьшалось, параоксон не приближался к каталитическому тирозину. Что касается альбумина крысы, согласно полученным данным, в присутствии диазепама после ряда

конформационных изменений в точке 5 нс (5000 пс) параоксон приблизился к каталитическому тирозину и оставался в этой позиции на протяжении оставшегося времени. На участке 6-8 нс (6000-8000 пс) значение  $\text{distP-O}$  незначительно колебалось в районе 0.4 ангстремов. Таким образом, согласно полученным данным, диазепам усиливает вероятность эстеразной реакции в сайте Садлоу I альбумина крысы, но не влияет на активность альбумина человека. Что касается молекулы диазепама в сайте Садлоу II ЧСА и КСА, ее положение стабильно на протяжении всего периода симуляции, не зависимо от того, есть ли параоксон в сайте Садлоу I.

Мы проанализировали положение параоксона в сайте Садлоу I альбуминов человека и крысы в отсутствие и в присутствии диазепама в сайте Садлоу II. Для альбумина человека конформационный анализ положения молекулы параоксона в конечной точке траектории показал, что и в случае свободного сайта Садлоу II, и в присутствии диазепама в сайте Садлоу II молекула параоксона имеет схожую конформацию внутри сайта Садлоу I (Рисунок 12а, б). В этих комплексах молекула параоксона «вытянута» вдоль полости сайта, нитрогруппа располагается вблизи выхода из сайта возле аминокислотных остатков Arg218 и Arg222. Конформация самого сайта также практически не зависит от присутствия диазепама. Положение параоксона в сайте Садлоу I КСА отличается от его положения лиганда в ЧСА. В случае КСА без диазепама нитрогруппа параоксона взаимодействует с Lys199 (Рисунок 12в), в присутствии диазепама – с Asn242 (Рисунок 12г). Сайт Садлоу I альбумина крысы имеет ряд существенных отличий от сайта Садлоу I альбумина человека. Так, аминокислотам His242, His288, Ile264, Leu219 в молекуле ЧСА соответствуют аминокислоты Asn242, Gln288, Met264, Met219 в молекуле КСА. Появление дополнительных электроотрицательных атомов (серы и кислорода) ожидаемо влияет на положение параоксона, имеющего в своей структуре отрицательно заряженные кислороды и положительно

заряженный фосфор. Более того, согласно полученным данным, появление диазепама влияет на конформацию сайта Садлоу I КСА, более всего на взаимное расположение аминокислот Arg218, Glu292 и Arg195. В случае отсутствия диазепама эти остатки сближаются, закрывая «вход» в сайт Садлоу I (Рисунок 12г). Таким образом, по данным конформационного анализа, альбумин крысы более чувствителен к добавлению диазепама.



**Рисунок 12.** Конформация молекулы параоксона (РОХ) в сайте Садлоу I ЧСА (а, б) и КСА (в, г) в отсутствие (а, в) и в присутствии (б, г) молекулы диазепама (DIA) в сайте Садлоу II по данным молекулярной динамики.

На следующем этапе из траекторий молекулярной динамики были оценены значения свободных энергий образования комплексов ЧСА и КСА с диазепамом и параоксоном, характеризующие сродство альбумина к этим лигандам. Полученные значения представлены в Таблице 12.

Параоксон практически не влияет на сродство ЧСА и КСА по отношению к диазепаму, что согласуется с данными, накопленными нами и другими исследователями, о том, что сайт Садлоу II слабо подвержен модуляции. Можно также отметить, что, согласно полученным данным, сродство диазепама к КСА лучше, чем к ЧСА. Ранее нами экспериментальными методами было показано, что КСА лучше ЧСА связывает ибупрофен (Гончаров и др., 2017). Диазепам не влияет на сродство сайта Садлоу I ЧСА к параоксону, но существенно ухудшает сродство сайта Садлоу I КСА (Таблица 12). 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, указывающими на конкурентное ингибирование диазепамом гидролиза НФА в сайте Садлоу II. 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.

**Таблица 12.** Значения свободных энергий ( $\Delta G$ , ккал/моль) образования комплексов альбумина человека (ЧСА) и крысы (КСА) с диазепамом в сайте Садлоу II и параоксон ом в сайте Садлоу I в присутствии и отсутствие друг друга.

	Диазепам в отсутствие параоксона	Диазепам в присутствии параоксона	Параоксон в отсутствие диазепама	Параоксон в присутствии диазепама
ЧСА	-28.6±2.3	-27.1±2.4	-20.8±2.5	-20.9±2.6
КСА	-30.7±1.8	-30.1±2.2	-22.4±2.0	-12.0±3.4

Подводя итог, можно отметить, что жирные кислоты, по-видимому, играют важную роль в регуляции антиоксидантных свойств альбумина. Впервые к такому выводу пришли Грызунов с соавторами (Gryzunov et al., 2003). Связывание ЖК альбумином изменяет конформацию сайтов Sudlow I и II и увеличивает квантовый выход флуоресценции дансиламида (лиганд

сайта Sudlow I) и дансилсаркозина (лиганд сайта Sudlow II); кроме того, ЖК увеличивали стерическую доступность тиоловой группы Cys34 и усиливали ее реакционную способность по отношению к 5,5'-дителибис-2-нитробензойной кислоте (DTNB). Таким образом, связывание ЖК создает предпосылки для одновременной регуляции двух важных функций белка: транспортной и антиоксидантной (Gryzunov et al., 2003). Что касается ЭЗЧ, в эксперименте *in vivo* был продемонстрирован положительный эффект ЭЗЧ на снижение степени тяжести отставленных последствий при отравлении крыс параоксоном (Гончаров и др., 2019б). 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 оказывать аллостерический эффект 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 требует дальнейшего изучения.

Без сомнения, применяемые в данной работе методики имеют ряд ограничений. Так, с помощью метода ЯМР можно качественно увидеть выход продукта истинной эстеразной реакции, катализируемой альбумином, однако стандартные настройки не позволили нам количественно определить кинетические характеристики данной реакции. Это связано с тем, что, если учитывать время спин-решеточной релаксации ядер исследуемых групп, сканирование одной временной точки занимает несколько минут, за которые может существенно измениться концентрация продукта. Требуется кропотливый подбор параметров

сканирования, который бы позволил с наименьшей погрешностью количественно оценить кинетические параметры эстеразной активности альбумина с помощью ЯМР. Это является нашей задачей на ближайшее будущее.

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). Эффект краудинга был продемонстрирован и для альбумина с помощью рамановской спектроскопии: плотная среда влияет на прочность внутримолекулярных водородных связей в молекуле БСА, в результате чего молекула приобретает более компактную структуру (Ota et al., 2016). Таким образом, можно предположить, что константы связывающей и эстеразной активности альбумина в кровотоке будут отличаться от констант, измеренных в «идеальном растворе» в экспериментах *in vitro* и *in silico*. 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 атом-атомных потенциалов или метод молекулярной механики, в котором, в отличие от квантово-механического приближения, молекула



рассматривается не как совокупность ядер и электронов, а как система атомов, законы взаимодействия между которыми описываются эмпирически установленными функциями. Основным недостатком молекулярной механики состоит в том, что с помощью этого приближения невозможно 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) Восстановление тиоловых групп альбумина усиливает аффинность к НФА сайта Садлоу II, но не влияет на положение молекулы НФА в этом сайте и значение скорости  $V_{max}$ . Восстановление ослабляет аффинность к НФА сайта Садлоу I, тогда как взаимодействие с параоксоном имеет видовые особенности: восстановление Cys34 БСА ослабляет аффинность сайта Садлоу I к параоксону, тогда как сродство сайта Садлоу I ЧСА к параоксону не зависит от редокс-статуса остатка цистеина.

3) 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) Полифенолы зеленого чая оказывают 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.

### **Публикации по теме диссертации**

#### *Статьи в рецензируемых журналах*

1. Д.А. Белинская. Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность альбумина по отношению к

- фосфорорганическим соединениям по данным молекулярного моделирования/Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров// Токсикологический вестник. — 2019. № 3 (156). — с.26-32.
2. Д.А. Белинская. Влияние редокс-статуса бычьего сывороточного альбумина на его взаимодействие с параоксоном по данным молекулярного моделирования/Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2020. Том 56. № 3. — с.98–101.
  3. D.A. Belinskaia. The effect of resveratrol on binding and esterase activity of human and rat albumin/D.A. Belinskaia, **A. A. Batalova**, N. V. Goncharov//Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2019. V.55. — p.174.
  4. Д.А. Белинская. Влияние степени окисления остатка cys34 альбумина на взаимодействие белка с параоксоном по данным молекулярного моделирования/ Д.А. Белинская, М.А. Терпиловский, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров//Биоорганическая химия. — 2019. Том 45. № 6. — с.640-649.
  5. D.A. Belinskaia. The Universal Soldier: Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Functions of Serum Albumin/D.A. Belinskaia, P.A. Voronina, V.I. Shmurak, M.A. Vovk, **A.A. Batalova**, R.O. Jenkins, N.V. Goncharov//Antioxidants. — 2020. V. 9. — E.966.
  6. D.A. Belinskaia. Serum Albumin/Daria A. Belinskaia, Polina A. Voronina, **Anastasia A. Batalova** and Nikolay V. Goncharov//Encyclopedia. — 2021. — с.67-75.

#### *Статьи в сборниках*

1. Д.А. Белинская. Тестирование полифенолов и жирных кислот в качестве модуляторов эстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям/Д.А. Белинская,

- А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров//Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения. Сборник трудов Седьмой научной конференции с международным участием. — 2019. — с.428-434.
2. Д.А. Белинская. Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей бычьего сывороточного альбумина на его связывающую и псевдоэстеразную активность по данным компьютерного моделирования/Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров // В: В.Д. Лахно, (Ред.). Доклады Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика». Пущино. ИМПБ РАН. — 2020. — Т. 8. — Е. 10.
  3. Воронина П.А. Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на ферментативную активность бычьего сывороточного альбумина в эксперименте *in vitro* /П.А. Воронина, В.И. Шмурак, **А.А. Баталова**, Д.А. Белинская, Н.В. Гончаров// 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. Взаимодействие альбумина с эндотелиальными клетками: гликокаликс, трансцитоз и скавенджер-рецептор CD36. / Воронина П.А., Шмурак В.И., **Баталова А.А.**, Гончаров Н.В. // В: А.В. Бережнов, В.П. Зинченко (ред.) Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей международной конференции. — 2021. — с.27-31.

#### *Тезисы*

1. Д.А. Белинская. Роль альбумина в модификации кинетики лекарственных и токсических соединений / Д.А. Белинская, П.А. Воронина, В.И. Шмурак, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров // 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.
2. Д.А. Белинская. Взаимодействие сывороточного альбумина человека, быка и крысы со специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и Садлоу II по данным молекулярного моделирования/ Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров //Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. — 2019. — с.85-86.
  3. Баталова А.А. Взаимодействие параоксона с альбуминами человека и быка с различной степенью окисления Cys34: сравнительный анализ методами молекулярного моделирования / **А.А. Баталова**, Д.А. Белинская, Н.В. Гончаров // Сборник тезисов докладов VII молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН 2020 г. — 2020. — с.42-43.
  4. Н.В. Гончаров. Проблемы доклинического тестирования препаратов, взаимодействующих с альбумином. /Н.В. Гончаров, Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, В. И. Шмурак //Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. Сборник тезисов докладов пятой Междисциплинарной конференции. — 2019. — с.140.
  5. Белинская Д.А. Влияние бензодиазепинов на взаимодействие сывороточного альбумина человека с фосфорорганическими соединениями по данным молекулярного моделирования / Д.А. Белинская, П.А. Воронина, **А.А. Баталова** // Материалы Всероссийского Конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» — 2020. — с.465-468.
  6. Белинская Д.А. Альбумин – интегративный белок плазмы крови. Методология исследования. / Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров // Тезисы Всероссийской конференции с международным

- участием «Интегративная физиология», посвящённой 170-летию со дня рождения И.П. Павлова. — 2019. — с.33-34.
7. Белинская Д.А. In silico анализ влияния степени окисления альбумина на его связывающую и эстеразную активность по отношению к фосфорорганическим соединениям. / Д.А. Белинская, **А.А. Баталова**, Н.В. Гончаров // Сборник научных трудов, представленных на VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезде биохимиков России и IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды». — 2019. — с.81-82.
  8. Баталова А.А. Сравнительный анализ ингибирования альбумина человека, быка и крысы ибупрофеном и варфарином по данным молекулярного моделирования. / **А.А. Баталова**, Д.А. Белинская, Н.В. Гончаров // Сборник тезисов VI молодёжной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. — 2018. — с.8-10.

### Список цитируемой литературы

- Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Теоретические и прикладные аспекты эстеразной активности альбумина. // Биоорганическая химия. — 2020. — Т. 46. — № 3. — С. 247-260.
- Белинская Д.А., Шмурак В.И., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Сывороточный альбумин: поиск новых сайтов взаимодействия с фосфорорганическими соединениями на примере зомана. // Биоорганическая химия. — 2014. — том 40. — № 5. — с. 541-549.
- Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О ферментативной активности альбумина. // Биоорганическая химия. — 2015. — Т. 41. — № 2. — С. 131.
- Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Белинская Д.А., Соболев В.Е., Шмурак В.И., Корф Е.А., Авдонин П.В. Крыса (*rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Системный анализ эффективности экстракта зеленого чая в качестве средства предупреждения отставленных последствий отравления. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2019. — Т. 55. — № 3. — С. 188-198.
- Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Соболев В.Е., Корф Е.А., Белинская Д.А. Проблема безопасности применения нутрицевтиков // Усп. совр. биол. — 2019а. — Т. 139. — № 5. — С. 487-499.

Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Сравнительный анализ эстеразной и параоксоназной активности различных видов альбумина // ЖЭБФ. — 2017. — Т. 53. — № 4. — С. 241-250.

Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. Биохимические аспекты. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2019б. — Т. 55. — № 2. — С. 104-114.

Таборская К.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Построение трехмерной модели молекулы крысиного альбумина методом гомологичного моделирования // ЖЭБФ. — 2017. — Т. 53. — № 5. — С. 342-350.

Шмурак В.И. Сравнительный анализ связывающей и эстеразной активности сывороточного альбумина человека, быка и крысы. Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук. 21.06.2018, Санкт-Петербургский Государственный Университет — 2018. — Санкт-Петербург.

Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. // SoftwareX. — 2015. — 1–2. — 19–25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001

Acosta-Silva C., Bertran J., Branchadell V., Oliva A. Kemp Elimination Reaction Catalyzed by Electric Fields. // Chemphyschem. — 2020. — 21(4). — 295–306. <https://doi.org/10.1002/cphc.201901155>

Ali S.T., Karamat S., Kóňa J., Fabian WM. Theoretical prediction of pKa values of seleninic, selenenic, sulfinic, and carboxylic acids by quantum-chemical methods. // J. Phys. Chem. A. — 2010. — 114(47). — 12470-12478. doi:10.1021/jp102266v

Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., di Nola A., van Gunsteren W.F., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. // J. Chem. Phys. — 1984. — 81. — 3684–3690. doi: 10.1063/1.448118.

Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In Intermolecular Forces. // The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, Pullman, B., Ed. — Springer: Dordrecht, the Netherlands — 1981. — v.14. — pp. 331–342.

Bertucci C., Nanni B., Raffaelli A., Salvadori P. Chemical modification of human albumin at cys34 by ethacrynic acid: Structural characterisation and binding properties. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1998. — 18. — 127–136.

Bussi G., Zykova-Timan T., Parrinello M. Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. // J. Chem. Phys. — 2009. — 130(7). — 074101. doi: 10.1063/1.3073889.

Chauhan B., Kumar G., Kalam N., Ansari S.H. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review // J. Adv. Pharm. Technol. Res. — 2013. — V.4. — P.4–8.

Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. // J. Chem. Phys. — 1993. — 3. — 10089–10092. doi: 10.1063/1.464397.

Dasgupta A., Crossey M.J. Elevated free fatty acid concentrations in lipemic sera reduce protein binding of valproic acid significantly more than phenytoin. // Am. J. Med. Sci. — 1997. — 313(2). — 75-79. doi:10.1097/00000441-199702000-00001

Di Simplicio P., Frosali S., Priora R., et al. Biochemical and biological aspects of protein thiolation in cells and plasma. // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2005. — 7(7-8). — 951-963. doi:10.1089/ars.2005.7.951

Eaton J.D., Williamson M.P. Multi-site binding of epigallocatechin gallate to human serum albumin measured by NMR and isothermal titration calorimetry. // *Biosci. Rep.* — 2017. — 37(3). doi:10.1042/BSR20170209

Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. // *IUBMB Life* — 2005. — 57. — 787–796. <https://doi.org/10.1080/15216540500404093>.

Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. // *Biotechniques* — 1993. — 14(6). — 1010-1013.

Funk W.E., Li H., Iavarone A.T., Williams E.R., Riby J., Rappaport S.M. Enrichment of cysteinyl adducts of human serum albumin. // *Anal. Biochem.* — 2010. — 400(1). — 61-8.

Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. // *Expert. Opin. Drug. Discov.* — 2015. — 10(5). — 449-461. doi:10.1517/17460441.2015.1032936

Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. // *J. Mol. Biol.* — 2005.— 353(1). — 38-52. doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075

Grigoryan H., Li H., Iavarone A.T., Williams E.R., Rappaport S.M. Cys34 Adducts of Reactive Oxygen Species in Human Serum Albumin. // *Chem. Res. Toxicol.* — 2012. — 25. — 1633–1642.

Gryzunov Y.A., Arroyo A., Vigne J.L. et al. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2003. — 413(1). — 53-66. doi:10.1016/s0003-9861(03)00091-2

Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. // *J. Comp. Chem.* — 1997. — 18. — 1463–1473.

Ikegaya K., Nokihara K., Yasuhara T. Characterization of sulfhydryl heterogeneity in human serum albumin and recombinant human serum albumin for clinical use. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2010. — 74(11). — 2232-2236. doi:10.1271/bbb.100423

Kumari R., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g\_mmpsa GROMACS tool for high-throughput MM-PPSA calculations. // *J. Chem. Inf. Model.* — 2014. — 54(7). — 1951-1962. doi:10.1021/ci500020m

Kurano M., Yasukawa K., Ikeda H., Aoki J., Yatomi Y. Redox state of albumin affects its lipid mediator binding characteristics. // *Free Radic. Res.* — 2019. — 53. — 892–900. doi:10.1080/10715762.2019.1641603.

Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. What macromolecular crowding can do to a protein. // *Int. J. Mol. Sci.* — 2014. — 15. — 23090–230140. <https://doi.org/10.3390/ijms151223090>.

Latruffe N., Menzel M., Delmas D., Buchet R., Lançon A. Compared binding properties between resveratrol and other polyphenols to plasmatic albumin: consequences for the health protecting effect of dietary plant microcomponents // *Molecules.* — 2014. — v. 19. — p. 17066–17077.



- Li B., Nachon F., Froment M.T., Verdier L., Debouzy J.C., Brasme B., Gillon E., Schopfer L.M., Lockridge O. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin. // *Chem. Res. Toxicol.* — 2008. — 21. — 421–431. <https://doi.org/10.1021/tx700339m>.
- Lockridge O., Xue W., Gaydess A., Grigoryan H., Ding S.J., Schopfer L.M., Hinrichs S.H., Masson P. Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. // *J. Biol. Chem.* — 2008. — Aug 15. — 283(33). — 22582-90.
- Lyskov S., Chou F.C., Conchúir S.Ó. et al. Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE) // *PLoS One.* — 2013. — 8(5). — e63906. Published 2013 May 22. doi:10.1371/journal.pone.0063906
- Nagumo K., Tanaka M., Chuang V.T.G., Setoyama H., Watanabe H., Yamada N., Kubota K., Tanaka M., Matsushita K., Yoshida A. et al. Cys34-Cysteinylated Human Serum Albumin Is a Sensitive Plasma Marker in Oxidative Stress-Related Chronic Diseases. // *PLoS One.* — 2014. — 9. — e85216. doi: 10.1371/journal.pone.0085216.
- Nozaki A.I., Kimura T., Ito H., Hatano T. Interaction of polyphenolic metabolites with human serum albumin: a circular dichroism study // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* — 2009. — v. 57. — p. 1019–1023.
- Ota C., Takano K. Behavior of Bovine Serum Albumin Molecules in Molecular Crowding Environments Investigated by Raman Spectroscopy // *Langmuir.* — 2016. — 32. — 7372–7382. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01228>.
- Poole L.B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. // *Free Radic. Biol. Med.* — 2015. — 80. — 148-157. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013
- Rabbani G., Ahn S.N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2019. — 123. — 979-990. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053
- Reichenwallner J., Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2013. — 1830(12). — 5382-5393. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.031
- Rizzuti B., Bartucci R., Sportelli L., Guzzi R. Fatty acid binding into the highest affinity site of human serum albumin observed in molecular dynamics simulation. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2015. — 579. — 18-25. doi:10.1016/j.abb.2015.05.018
- Röthlisberger D., Khersonsky O., Wollacott A.M., Jiang L., DeChancie J., Betker J., Gallaher J.L., Althoff E.A., Zanghellini A., Dym O., Albeck S., Houk K.N., Tawfik D.S., Baker D. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. // *Nature* — 2008. — 453. — 190–195. <https://doi.org/10.1038/nature06879>
- Sakamoto S., Komatsu T., Ueno T., Hanaoka K., Urano Y. Fluorescence detection of serum albumin with a turnover-based sensor utilizing Kemp elimination reaction. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2017. — 27. — 3464–3467. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.076>
- Sanchez E., Lu S., Reed C., Schmidt J., Forconi M. Kemp Elimination in Cationic Micelles: Designed Enzyme-Like Rates Achieved through the Addition of Long-Chain Bases. // *J. Phys. Org. Chem.* — 2016. — 29. — 185–189. <https://doi.org/10.1002/poc.3515>
- Sand K.M., Bern M., Nilsen J., Noordzij H.T., Sandlie I., Andersen J.T. Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. // *Front. Immunol.* — 2015. — 5. — 682. doi:10.3389/fimmu.2014.00682

Tabata F., Wada Y., Kawakami S., Miyaji K. Serum Albumin Redox States: More Than Oxidative Stress Biomarker. // *Antioxidants* (Basel). — 2021. — 10(4). — 503. doi: 10.3390/antiox10040503.

Tildon J.T., Ogilvie J.W. The esterase activity of bovine mercaptalbumin. The reaction of the protein with p-nitrophenyl acetate. // *J. Biol. Chem.* — 1972. — 247(4). — 1265-1271.

Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comput. Chem.* — 2010. — 31(2). — 455–461. doi: 10.1002/jcc.21334

Turell L., Radi R., Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. // *Free Radic. Biol.* — 2013. — Med 65. — 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>.

Van Der Vusse G.J. Albumin as Fatty Acid Transporter. // *Drug Metab. Pharmacokinet.* — 2009. — 24. — 300–307.

Vorum H., Honoré B. Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1996. — 48(8). — 870-875. doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb03990.x

Zhang Y., Kua J., McCammon J.A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — 124(35). — 10572-10577. doi:10.1021/ja020243m