

## ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ У ДЕЯКИХ ПРЕДСТАВНИКІВ ТВАРИННОГО СВІТУ

Г. В. Пехіменко, Т. М. Кучмеровська\*

Таврійський національний університет ім. В. І. Вернадського

\*Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України

*Проведено порівняльний аналіз фізико-хімічних характеристик сироваткових альбумінів деяких представників класів плазунів: середньоазіатська черепаха (Testudo horsfieldi), полоз жовточеревий (жовтобрюх) (Coluber jugularis), вуж водяний (Natrix tessellata) і вуж звичайний (Natrix natrix) і птахів: гусак домашній (Anser Anser), курка домашня (Gallus domesticus), качка домашня (Anas platyrhyncha) та сизий голуб (Columba livia). Виявлено, що не дивлячись на близькість структурної організації досліджуваних сироваткових альбумінів, вони відрізняються за молекулярною масою, поверхневим зарядом молекули, коефіцієнтом електрофоретичної рухливості та вмістом протеїну в кров'яному руслі, при цьому ці показники всередині класів є стабільними, однак, вищі у представників класу птахів у порівнянні з класом плазунів.*

**Ключові слова:** СИРОВАТКОВИЙ АЛЬБУМІН, ПРЕДСТАВНИКИ КЛАСІВ ПЛАЗУНІВ ТА ПТАХІВ, МОЛЕКУЛЯРНА МАСА, КОЕФІЦІЄНТ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОЇ РУХЛИВОСТІ, ВМІСТ ПРОТЕЇНІВ

У живих організмах протеїни є відповідальними практично за всі процеси, які відбуваються в клітинах, починаючи від утворення клітин різної форми, їх внутрішньої організації, підтримання внутрішнього середовища, ензиматичної активності, руху і т.п. Обмін протеїнів значною мірою є відповідальним за їх гомеостаз [1]. Внутрішньоклітинна відповідь на вплив екзогенних чинників здійснюється також за участю протеїнів. Структурно і функціонально ці макромолекули відрізняються як всередині окремого живого організму, так і між різними представниками тваринного та рослинного світу. Вплив різних, як ендо- так і екзогенних чинників на живі організми в першу чергу відображається на протеїнах крові, зокрема і на альбуміні, що за їхньої дії змінюються як структурно так і функціонально [2–4]. Більше того, на сьогодні перспективність вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей сироваткових альбумінів представників різних класів тваринного світу надзвичайно важлива тому, що молекули протеїнів представляють собою природні наночастинки, які володіють з одного боку специфічними біологічними функціями, а з іншого – властивостями, котрі притаманні наносистемам, що надзвичайно важливо для розвитку нанотехнологій [5, 6]. Так, альбуміни застосовують для гальмування адсорбції інших протеїнів і для запобігання неспецифічній адгезії клітин [7].

Сироватковий альбумін, який належить до водорозчинних глобулярних протеїнів – один з найбільш досліджених протеїнів плазми крові [2–4]. Однак, дослідники намагаються знайти відповіді на численні запитання, а саме: яким чином у тварин, що знаходяться на різних щаблях еволюційного розвитку виникли молекулярні системи, які виконують аналогічні функції; в якому напрямку вони розвиваються; як відбувається процес інтеграції в більш складні системи організму та на ряд інших біологічних питань. На значну частину цих питань може дати відповідь порівняльний біохімічний аналіз гомологічних протеїнів різних класів і видів представників тваринного світу.

Мета роботи – дослідження фізико-хімічних властивостей сироваткових альбумінів у різних представників класів плазунів і птахів в аспекті їх функціональної активності.

### Матеріали і методи

Об'єктами досліджень слугували представники двох класів хребетних тварин: птахів та плазунів. Такий вибір був обумовлений тим, що у птахів, як теплокровних та більш розвинених тварин, перебіг метаболічних процесів відбувається інтенсивніше у порівнянні з холоднокровними плазунами. Тому можна було очікувати, що представники цих класів будуть різнитися і за фізико-хімічними характеристиками протеїнів, зокрема сироваткових альбумінів. Для проведення досліджень серед птахів були вибрані: гусак домашній (Anser anser), курка домашня (Gallus domesticus), качка домашня (Anas platyrhyncha), голуб сизий (Columba livia), серед плазунів – черепаха середньоазіатська (Testudo horsfieldi), вуж водяний (Natrix tessellata), вуж звичайний (Natrix natrix), полоз жовточеревий (Coluber jugularis). Кожна видова група була представлена 12–15 тваринами. У всіх досліджуваних тварин збір крові для виділення альбумінів здійснювали восени.

Сироваткові альбуміни статевозрілих тварин були препаративно виділені за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі та очищені за допомогою діалізу [8–11]. При проведенні досліджень використовували тільки мономірні препарати альбуміну. З метою перевірки чистоти

мономірних препаратів альбуміну, проводили аналітичний електрофорез в поліакриламідному гелі згідно з методом [8]. Для цього було використано вертикальний апарат для аналітичного електрофорезу фірми «Reanal» (Угорщина). Формування гелю здійснювали в трубочках з внутрішнім діаметром 0,3–0,5 мм, висота розділяючого гелю становила 7–8 см, 7,5 % поліакриламідний гель готували на трис-НСІ буфері, рН 8,9. Над розділяючим гелем формували концентруючий гель висотою 5 мм, при цьому рН трис-гліцинового електродного буфера становив 8,3. Електрофорез проводили при напрузі 40 В/см та силі струму 2,5 мА на трубочку.

У кожену трубочку вносили 0,01 мл сироватки крові, що містила 250 мкг протеїну. Коли межа Кольрауша, що маркується бромфеноловим синім, досягала кінця гелевого стовпчика, електрофорез припиняли, зазвичай, час електрофорезу становив 3–4 години. Після закінчення електрофорезу для виявлення загальних протеїнів гелі забарвлювали 1 % розчином амідочорного на 7 % оцтової кислоти протягом 30 хвилин. В якості диференціюючого розчину використовували 7 % оцтову кислоту. Коефіцієнт електрофоретичної рухливості (КЕР) сироваткових альбумінів розраховували наступним чином: довжину шляху, пройденого нанесеною фракцією, ділили на довжину шляху, пройденого індикаторною фарбою.

Визначення відсотку вмісту альбуміна в сироватці крові здійснювали шляхом денситометрії забарвлених гелевих стовпчиків на спеціально виготовленій приставці до спектрофотометру «Specord» (Німеччина) при довжині хвилі 620 нм. Відносний вміст альбуміну по відношенню до суми інших загальних протеїнів сироватки крові оцінювали за денситограмою гравіметрично (за вагою піку альбуміна до суми відповідних протеїнових фракцій). Середня похибка цього методу становила приблизно 3 % [12]. Дані, отримані при застосуванні денситометрії, узгоджувалися з результатами визначення вмісту протеїнів згідно з методом Лоурі, при елюції фракцій цих протеїнів з поліакриламідного гелю.

Визначення молекулярної маси досліджуваних альбумінів проводили методом гель-фільтрації в тонкому шарі сефадекса. На відміну від інших методів, переваги цього методу полягають у простоті обладнання, можливості використання відносно малих кількостей матеріалу, незначними витратами часу при порівняно низькій похибці методу біля 2 % [13]. Для гель-фільтрації використовували сефадекс G-100 «Superfine» з розрахунку 1,8 г на скляну пластину розміром 20x20 см, який перед нанесенням на пластину поміщали на 3 доби в 0,2 М фосфатний буфер, рН 7,0 для набухання. Пластина з нанесеним гелем встановлювали у спеціально виготовлену камеру, після чого у заздалегідь намічені місця в гелі вносили по 5 мкл 1 % розчину досліджуваних протеїнів та протеїнів-стандартів. В якості стандартних протеїнів використовували  $\gamma$ -глобулін людини (отриманий в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України), гемоглобін людини («Reanal», Угорщина),  $\alpha$ -хімотрипсин і трипсин великої рогатої худоби (відповідно фірми «Reaxim», Росія і «Spofa», Чехія) і кристалічний ячний лізоцим. Тривалість досліду становила 6 годин при середній швидкості міграції 1 см/год і температурі навколишнього середовища 18–20 °С. Після закінчення фільтрації отримували репліку гелевої пластини, яку фарбували 0,5 % розчином бромфенолового синього. Потім, визначивши шлях, пройдений кожним протеїном (R, см), і побудувавши графік залежності між логарифмом молекулярної маси протеїнів-стандартів і коефіцієнтом міграції (1/R), розраховували молекулярну масу досліджуваного протеїну. Статистичну обробку одержаних даних здійснювали згідно з загально прийнятим методом з використанням t-критерію Стьюдента [14].

### **Результати й обговорення**

Дослідження фізико-хімічних властивостей альбумінів в аспекті з'ясування їх функціональної активності визначаються, в основному, двома чинниками: безпосередньо реалізованою в структурі протеїну генетичною програмою, а також потенційною здатністю макромолекул протеїну змінюватися в залежності від їхнього мікрооточення [15, 16].

Оскільки розкриття особливостей структурно-функціональних властивостей протеїнів, зокрема альбумінів, сприятиме встановленню існування зв'язків між внутрішніми закономірностями формування структури протеїну із закономірностями молекулярної еволюції, тому дослідження основних фізико-хімічних характеристик досліджуваних протеїнів є важливою біохімічною проблемою, вирішення якої дозволять наблизитися до розуміння цих закономірностей і зв'язків.

Результати досліджень продемонстрували, що молекулярна маса альбумінів представників класу птахів знаходиться у межах від 62400 до 65250 Да, в той час як у представників класу плазунів в дещо нижчих межах: від 60130 до 61080 Да. Слід зазначити, що між їхніми середніми значеннями існує достовірна різниця,  $p < 0,05$ . Тобто, молекулярна маса представників класу птахів достовірно вища за молекулярну масу представників класу плазунів на 4,4 %. При цьому даний показник знижується у птахів у послідовності: курка → гусак → голуб → качка, а у плазунів: вуж водяний → черепаха → полоз → вуж звичайний (рис. 1).

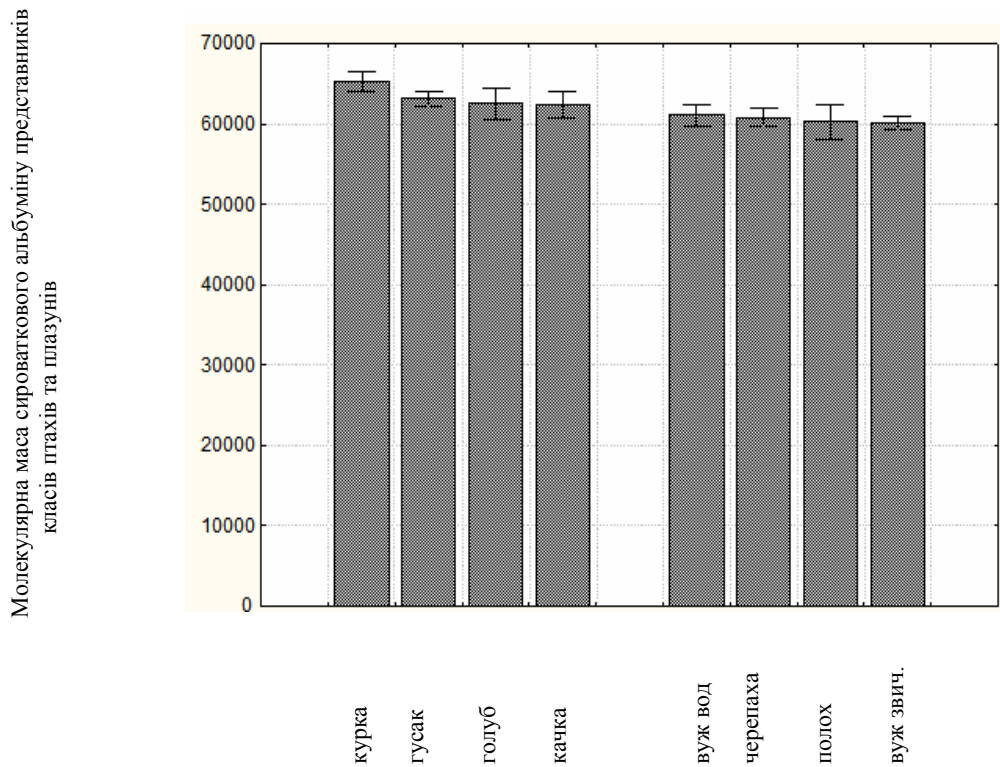


Рис. 1. Молекулярна маса сироваткових альбумінів представників класу птахів та плазунів, ( $M \pm m$ ,  $n=12$ )

Проведений аналіз кількостей протеїнових фракцій альбуміну у сироватці крові досліджуваних представників класів птахів та плазунів дозволив встановити, що найбільше протеїнових фракцій було у представників класу птахів. В той же час, всередині класу як птахів, так і (особливо) плазунів, кількість фракцій була однаковою. Тобто, отримані дані свідчать про те, що зниження кількості фракцій відбувалося згідно наступного ряду: курка  $\rightarrow$  гусак = качка  $\rightarrow$  голуб, а у плазунів – черепаха  $\rightarrow$  вуж водяний = полоз = вуж звичайний (рис. 2).

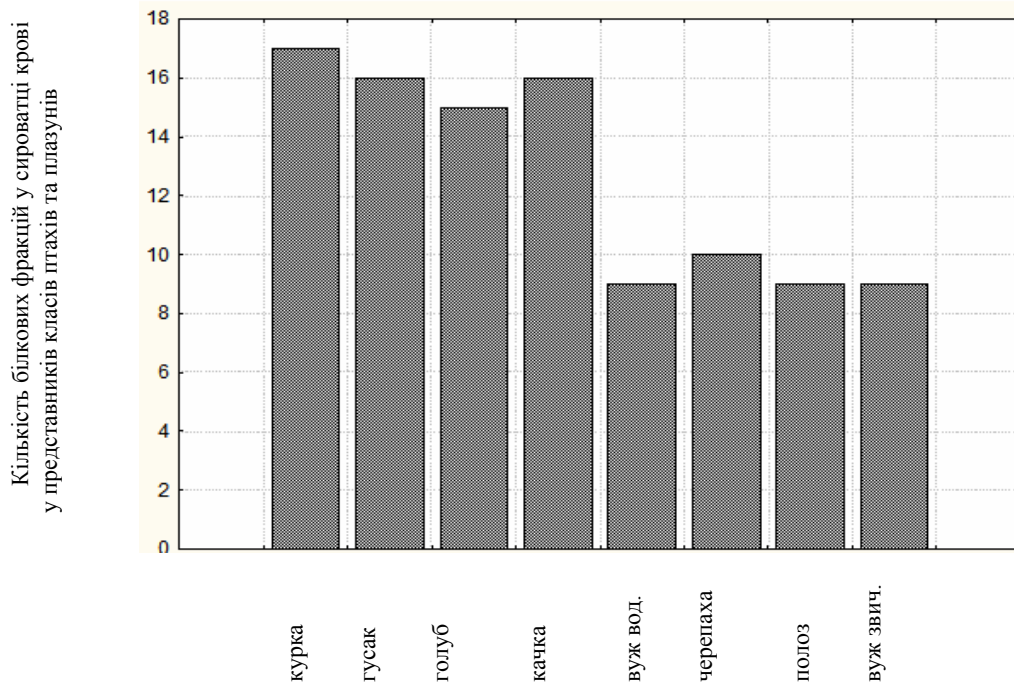


Рис. 2. Кількість протеїнових фракцій у сироватці крові у представників класів птахів та плазунів, ( $M \pm m$ ,  $n=12$ )

Що стосується коефіцієнту електрофоретичної рухливості за умов наших експериментів, то дослідження показали, що в альбуміновій фракції всіх досліджуваних видів птахів та плазунів він

приблизно однаковий, однак тільки в межах окремих класів. У птахів різниця показників становить не більше як 0,02 одиниці (0,75–0,77), в той же час у плазунів ця різниця значно більша і становить 0,05 одиниць (0,62–0,71) (табл.). Тобто, КЕФ альбумінів представників класу птахів достовірно вище ( $p < 0,05$ ) за такий, що визначено для альбумінів класу плазунів.

Близькі значення КЕР у сироваткових альбумінах досліджуваних видів всередині класів можуть свідчити про певну консервативність їхньої структурно-функціональної організації, що пов'язано з необхідністю підтримання на певному фізіологічному рівні кислотно-лужної рівноваги та інших біохімічних показників. При цьому слід зазначити, що у птахів, які належать до гомойотермних організмів, необхідність підтримання стабільності внутрішнього середовища вочевидь більш висока, тому саме цим можна пояснити більш високу відмінність КЕФ між досліджуваними класами тварин. Водночас це вказує на різні поверхневі заряди, а оскільки і молекулярна маса досліджуваних протеїнів у птахів та плазунів також достовірно відрізняються, то не виключено, що КЕФ може бути одним із показників, що їх маркує.

Таблиця

**Коефіцієнт електрофоретичної рухливості альбумінів сироватки крові у представників класів птахів і плазунів ( $M \pm m, n = 12$ )**

Об'єкт дослідж.	Качка	Голуб	Курка	Гусак	Вуж звичайний	Вуж водяний	Полоз	Черепаша
КЕР	0,71–0,78	0,73–0,80	0,73–0,81	0,72–0,81	0,65–0,71	0,67–0,72	0,66–0,75	0,58–0,65
Середня	0,75 ±0,04	0,77 ±0,04	0,77 ±0,04	0,77 ±0,05	0,69 ±0,02	0,70 ±0,03	0,71 ±0,05	0,62 ±0,05

Не дивлячись на те, що серед протеїнів плазми крові людини, альбуміни мають найбільший відсоток, порівняльні дані щодо різних груп тваринного світу поки що відсутні. Відомо, що загальний відсоток альбумінів є одним із найважливіших показників фізіологічного стану тваринного організму. Результати досліджень вмісту альбуміну (рис. 3) у піддослідних видів тварин дозволили виявити, що відсотковий вміст альбуміну в сироватці крові представників класу птахів достовірно вище аналогічного показника представників класу плазунів.

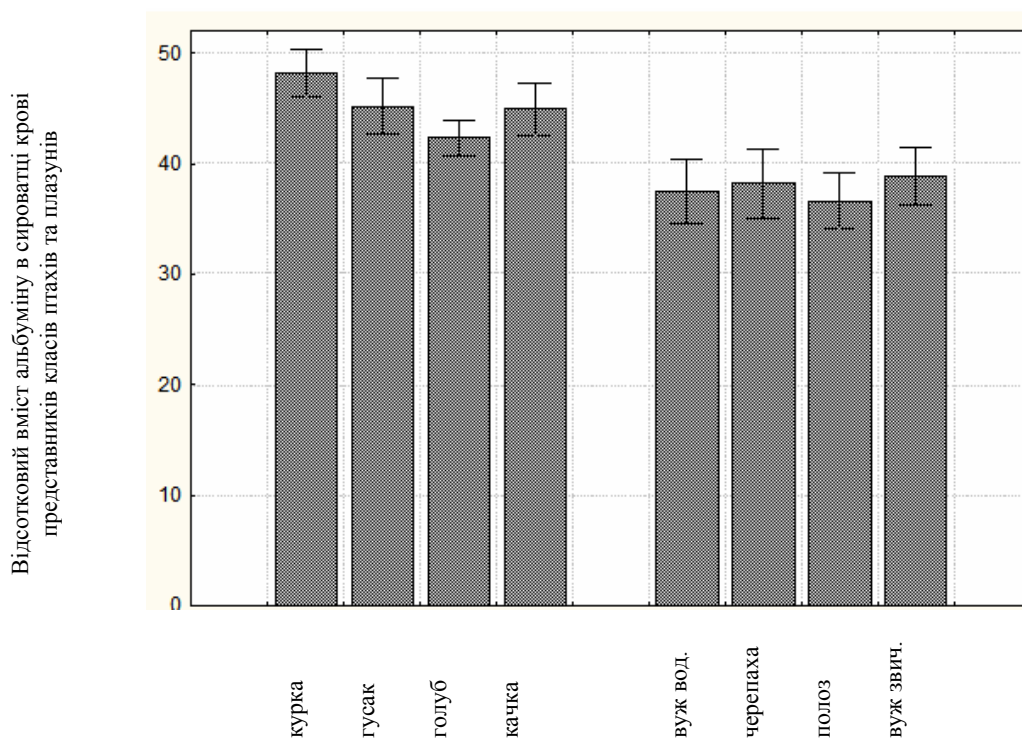


Рис. 3. Вміст альбуміну (%) в сироватці крові представників класів плазунів і птахів, ( $M \pm m, n = 12$ )

Всередині досліджуваних класів також спостерігали деякі відмінності, хоча вони були незначними (у птахів від 42,3 % до 48,2 %, у плазунів від 36,6 % до 38,9 %). Не зважаючи на те, що між класами існують достовірні відмінності ( $p < 0,05$ ), всередині класів даний показник можна вважати відносно стабільним. Не виключено, що виявлені відмінності між дослідженими тваринами можуть бути наслідком не лише їхнього еволюційного розвитку але і в деякій мірі впливом середовища, у якому вони мешкають [1, 2].

Таким чином, узагальнення отриманих даних (рис. 1–3, табл.), можна стверджувати, що всі досліджувані сироваткові альбуміни, не зважаючи на безумовну близькість їхньої структурної організації у різних представників класів птахів і плазунів, мають досить характерні відмінності. Особливо це стосується їхньої внутрішньої молекулярної структури, молекулярної маси, поверхневого заряду молекули, коефіцієнту електрофоретичної рухливості та вмісту в кров'яному руслі.

#### **Висновки**

Показано, що фізико-хімічні характеристики сироваткових альбумінів досліджуваних класів птахів та плазунів достовірно відрізняються, при цьому всі проаналізовані показники вищі у представників класу птахів у порівнянні з плазунами. Всередині класів всі фізико-хімічні показники сироваткового альбуміну є стабільними, що дозволяє вважати їх як такі, що можуть характеризувати (в певній мірі маркувати) досліджувані класи.

**Перспективність проведених досліджень.** Для оцінки молекулярних взаємодій, на даний часі використовуються прямі дуже чутливі оптичні методи із застосуванням поверхневого плазмонного резонансу [17]. Однак вони потребують позбавлення неспецифічних взаємодій, що можна забезпечити шляхом використання сироваткових альбумінів. Не виключено, що досліджені нами сироваткові альбуміни представників класів птахів та плазунів знайдуть застосування в цій галузі досліджень та в нанотехнології.

*G. V. Pekhimenko, T. M. Kuchmerovska*

### **PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SERUM ALBUMIN OF SOME REPRESENTATIVES OF ANIMAL WORLD**

#### **S u m m a r y**

Physical and chemical characteristics of serum albumins of some representatives of classes reptiles: Horsfield's tortoise (*Testudo horsfieldi*), Caspian whipsnake (*Coluber jugularis*), water snake (*Natrix tessellata*) and grass snake (*Natrix natrix*) and birds: domestic goose (*Anser anser*), domestic chicken (*Gallus domesticus*), domestic duck (*Anas platyrhynchos*) and dove colored (*Columba livia*), despite of their similarity of structural organization have differences in molecular mass, surface charge of molecule, coefficient of electrophoretic mobility and protein content in blood stream that depend on animals species. Moreover these indices inside of classes are stable however higher in representatives of birds classes as compared to reptiles classes.

*Г. В. Пехименко, Т. М. Кучмеровская\**

### **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ЖИВОТНОГО МИРА**

#### **А н н о т а ц и я**

Проведено анализ физико-химических характеристик сывороточных альбуминов некоторых представителей классов пресмыкающихся: среднеазиатская черепаха (*Testudo horsfieldi*), полоз желтобрюхий (*Coluber jugularis*), уж водяной (*Natrix tessellata*) и уж обыкновенный (*Natrix natrix*) и птиц: гусь домашний (*Anser Anser*), курица домашняя (*Gallus domesticus*), утка домашняя (*Anas platyrhynchos*) и голубь сизый (*Columba livia*). Обнаружено, что несмотря на сходность структурной организации исследуемых альбуминов, они отличаются по молекулярной массе, поверхностным зарядом молекулы, коэффициентом электрофоретической подвижности и содержанием протеина в кровеносном русле, при этом эти показатели внутри классов стабильны, однако выше у представителей класса птиц по сравнению с таковым пресмыкающихся.

1. Ховачка П. Биохимическая адаптация / П. Ховачка, Дж. Сомеро. – М. : Мир, 1998. – 568 с.
2. Джафаров Э. С. Структура и конформационные особенности сывороточного альбумина / Э. С. Джафаров, Л. А. Алиев. – Баку : Элм, 1990. – 204 с.
3. Carter D. C. Structure of serum albumin / D. C. Carter, J. X. Ho // Adv. Protein Chem. – 1994. – Vol. 45. – P. 152–203.
4. Луйк А. И. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов / А. И. Луйк, В. Д. Лукьянчук. – М. : Медицина, 1984. – 224 с.
5. Himmelhaus M. Cap-shaped gold nanoparticles for an optical biosensor / M. Himmelhaus, H. Takei // Sens. Actuators B: Chem. – 2000. – Vol. 63. – P. 24–30.

6. *Memisevic J.* Characterization of a novel ultra low refractive index material for biosensor application / J. Memisevic, V. Korampally, S. Gangopadhyay, S. A. Grant // *Sens Actuators B: Chem.* – 2009. – Vol. 141, N 1. – P.227–232.
7. *Kowalczyńska H. M.* Albumin adsorption on unmodified and sulfonated polystyrene surfaces, in relation to cell-substratum adhesion / H. M. Kowalczyńska, M. Nowak-Wyrzykowska, A. A. Szczepankiewicz et al. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2011. – Vol. 84, N 2. – P. 536–544.
8. *Ажицкий Г. Ю.* О возможности выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина / Г. Ю. Ажицкий, С. Н. Багдасарьян // *Лаб. дело.* – 1975. – № 12. – С. 712–714.
9. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685.
10. *Cleveland D. W.* Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis / D. W. Cleveland, S. G. Fischer, M. W. Kirschner et al. // *J. Biol. Chem.* – 1977. – Vol. 252, N 3. – P. 1102–1106.
11. *Davis B. J.* Dick electrophoreais. II. Method and application to human proteins / B. J. Davis // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 1964. – Vol. 121. – P 404–427.
12. *Остоловский Е. М.* О внутримолекулярной структуре сывороточного альбумина млекопитающих/ Е. М. Остоловский, А. Д. Боцянский, Б. А. Задорожный // *Биофизика.* –1990. – Т.35, №5. – С.762–764.
13. *Семак И. В.* Биохимия белков: практикум для студентов / И. В. Семак, Т. Н. Зырянова, О. И. Губич. – Минск : БГУ, 2007. – 49 с.
14. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 351 с.
15. *Уголев А. М.* Принципы организации и эволюции биологических систем / А. М. Уголев // *Журн. эвол. биохим. и физиол.* – 1989. – Т.25, №2. – С. 215–233.
16. *Dennis M. S.* Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins / M. S. Dennis, M. Zhang, Y. G. Mengetal. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 20, N 277. – P. 35035–3543.
17. *Hocheng H.* In-situ monitoring of pattern filling in nano-imprint lithography using surface plasmon resonance / H. Hocheng, W. H. Hsu, J. T. Shy // *J Nanosci. Nanotechnol.* – 2011. – Vol.11, N 6. – P. 5279–5284.

**Рецензент:** завідувач сектору інтелектуальної власності та маркетингу інновацій, кандидат біологічних наук, с. н. с. Грабовська О. С.