

Е. В. Диденко, А. В. Биалов

ТРИС-СТАБИЛИЗИРОВАННЫЙ БЕЛОК И КАТИОННОЕ ПАВ: МЯГКОЕ ИЗМЕНЕНИЕ РАЗМЕРА И ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЛОБУЛ БСА С ПОМОЩЬЮ ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Ключевые слова: белок-ПАВ взаимодействия, комплекс включения циклодекстрин-ПАВ, бычий сывороточный альбумин, додецилтриметиламмоний бромид, (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин, трис-стабилизированный белок, конформация, ξ -потенциал, дегидрофобизация триптофана.

Конформацией белка можно управлять с помощью ПАВ. Циклодекстрины образуют с ПАВ комплексы включения, поведение которых отличается от поведения обычных ПАВ в воде. Для выяснения роли различных типов взаимодействий в системе ПАВ-белок-циклодекстрин с помощью методов динамического рассеяния света (ДРС), электрофореза и флуоресцентной спектроскопии было изучено изменение размера, ξ -потенциала и флуоресценции триптофана ассоциатов катионного ПАВ, додецилтриметиламмоний бромида (ДТАБ), с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в присутствии (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрина (2ГПВЦД) в трис-буферированных водных растворах (рН=7,3). 2ГПВЦД образует прочный стехиометрический комплекс с ДТАБ и в присутствии 2ГПВЦД конформация белка в системе управляется соотношением 2ГПВЦД:ДТАБ. Если в системе нет мицелл ПАВ, то при добавлении 2ГПВЦД происходит разжатие (декомпактизация) глобулярного белка ассоциированного с ПАВ и при соотношениях 2ГПВЦД:ДТАБ<1 наблюдается бимодальное распределение по размерам частиц, которое переходит в мономодальное строго при соотношении 2ГПВЦД:ДТАБ=1, когда остаются только глобулы большего размера, чем в отсутствие 2ГПВЦД. Напротив, если в системе есть мицеллы ПАВ, то добавление 2ГПВЦД приводит к сжатию ассоциатов белок-ПАВ. Данные флуоресцентной спектроскопии показали, что конформационные изменения при добавлении 2ГПВЦД сопровождаются дегидрофобизацией окружения триптофана в объеме макромолекулы БСА. Характер зависимости электрокинетического потенциала ассоциатов белок-ПАВ от соотношения 2ГПВЦД:ДТАБ определяется соотношением ДТАБ:БСА. В данной статье мы стремимся связать наблюдаемое поведение с межмолекулярными взаимодействиями в системе.

Е. V. Didenko, A. V. Bilalov

TRIS-STABILIZED PROTEIN AND CATIONIC SURFACTANT: SOFT MODIFICATION OF SIZE AND ELECTROKINETIC POTENTIAL OF BSA GLOBULES USING CYCLODEXTRIN

Keywords: protein-surfactant interactions, cyclodextrin-surfactant inclusion complex, bovine serum albumin, dodecyltrimethylammonium bromide, (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, tris-stabilized protein, conformation, ξ -potential, tryptophan dehydrophobization.

Protein conformation can be controlled using surfactants. Cyclodextrins form inclusion complexes with surfactants, whose behavior differs from that of conventional surfactants in water. To elucidate the role of different types of interactions in the surfactant-protein-cyclodextrin system, changes in size, ξ -potential, and tryptophan fluorescence of associates of the cationic surfactant dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) with bovine serum albumin (BSA) in the presence of (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (2HP β CD) in Tris-buffered aqueous solutions (pH=7.3) have been studied using dynamic light scattering, electrophoresis, and fluorescence spectrometry. 2HP β CD forms a stable stoichiometric complex with DTAB, and in the presence of 2HP β CD, the conformation of the protein in the system is controlled by the 2HP β CD:DTAB ratio. If there are no surfactant micelles in the system, the addition of 2HP β CD causes the protein to decompactify, and at 2HP β CD:DTAB<1, a bimodal distribution of particle sizes is observed, which transitions to a unimodal distribution strictly at a ratio of 2HP β CD:DTAB=1, when only particles larger than in the absence of 2HP β CD remain. Conversely, if there are surfactant micelles in the system, the addition of 2HP β CD leads to compression of the protein-surfactant associates. Fluorescence spectroscopy data showed that conformational changes upon the addition of 2HP β CD are accompanied by dehydrophobization of the tryptophan environment within the BSA macromolecule. The dependence of the electrokinetic potential of protein-surfactant associates on the 2HP β CD:DTAB ratio is determined by the DTAB:BSA ratio. In this article, we aim to link the observed behavior with intermolecular interactions in the system.

Введение

Для усовершенствования белковых лекарственных форм [1] могут быть использованы специальные добавки, такие как катионные ПАВ и циклодекстрины, которые позволяют мягко модулировать свойства лекарственной формы.

В ранних исследованиях на примере додецилсульфата натрия (ДСН) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) с помощью флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма было показано [2], что белок под действием анионного ПАВ разворачивается, а при последующем добавлении β -циклодекстрина обратно сворачивается из-за потери связи

между БСА и ДСН. При сворачивании белка происходит восстановление вторичной структуры, утраченной при ДСН-индуцированном разворачивании.

Система БСА с катионным ПАВ не менее важна, так как она моделирует изменения функциональных свойств белков в *in vivo* клеточных системах, поэтому мы сфокусировали внимание на взаимодействии катионного ПАВ, додецилтриметиламмоний бромида (ДТАБ) с БСА. Фазовое поведение ДТАБ хорошо изучено [3]. Он имеет критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) 14 мМ в воде и

11 мМ в фосфатном буфере при pH=7,0 [4]. При высоких концентрациях ДТАБ образует гексагональную жидкокристаллическую фазу.

Многие интересовались взаимодействием ПАВ и циклодекстринов и, в частности, были представлены фазовые исследования тройных систем, состоящих из катионного ПАВ, ДТАБ, (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина (2ГПβЦД) и воды. Была опубликована фазовая диаграмма системы ДТАБ:2ГПβЦД:вода [5]. Детально было изучено влияние циклодекстринов на взаимодействие ПАВ-ДНК [6]. Известно, что циклические олигосахариды, циклодекстрины, могут использоваться для декомпактизации ДНК, которая была уплотнена катионным ПАВ [7, 8].

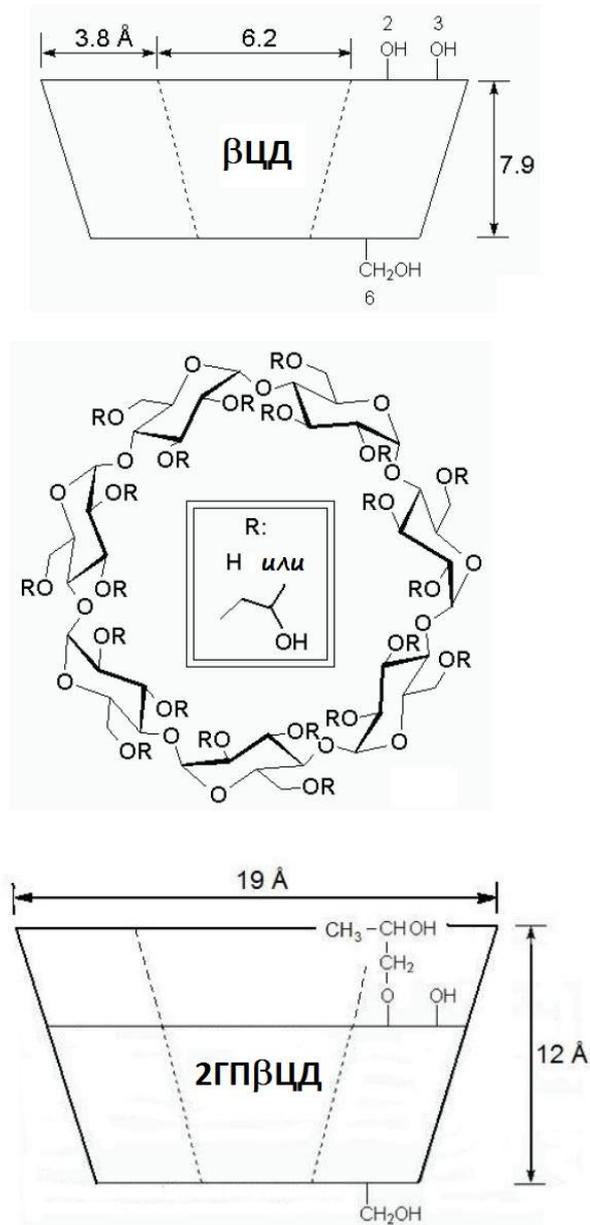


Рис. 1 – Торoidalная структура (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина (2ГПβЦД)

Fig. 1 – Toroidal structure of (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (2HPβCD)

2ГПβЦД (рис. 1) давно используется в лекарственных формах в качестве гидрофиллизатора гидрофобных

лекарств [9-11]. Кроме того, 2ГПβЦД способен сам активировать дендритные клетки, которые, в свою очередь, вызывают активацию Т-лимфоцитов, которые непосредственно уничтожают патоген-содержащие и злокачественные клетки [12, 13]. Механизм активирующего действия 2ГПβЦД на дендритные клетки до конца не выяснен. Предполагается [14], что активация происходит за счет того, что 2ГПβЦД усиливает транспортировку свободного холестерина к плазматической мембране. Однако, мы склонны предположить, что активация дендритной клетки происходит из-за влияния 2ГПβЦД на конформацию и поверхностный заряд трансмембранных белков, участвующих в процессах активации созревания клетки.

Итак, с целью выяснить как циклодекстрин может влиять на конформацию и поверхностный заряд белка, который связан с катионным ПАВ, мы приготовили ряд трис-буферированных водных растворов БСА, ДТАБ, 2ГПβЦД и их смесей и исследовали их с помощью методов динамического рассеяния света, электрофореза и флуоресцентной спектроскопии.

Экспериментальная часть

Материалы. В работе был использован лиофилизированный препарат белка бычий сывороточный альбумин (БСА) марки BSA.0025ф производства компании Диаэм (г. Москва) с содержанием основного вещества не менее 99,0%. Препарат соответствует стандартам качества и может использоваться в лабораторных исследованиях, включая ELISA, электрофорез, иммуноблоттинг и культивирование клеток. Использовался нами без дополнительной диализной очистки. Катионное ПАВ, додецилтриметиламмоний бромид (ДТАБ), марки Biochemica от Applichem (сейчас часть Merck) с содержанием основного вещества $\geq 99,0\%$ (по сухому веществу) было использовано без дополнительной перекристаллизации. (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин (2ГПβЦД) марки Biochemica от Applichem также был использован без дополнительной очистки. Для стабилизации БСА в растворах был использован трис(гидроксиэтил)аминометан (Трис) марки Sigma 7-9 от Applichem. Для приготовления растворов использовалась вода тройной дистилляции. Все остальные использованные реагенты были аналитической марки качества.

Приготовление образцов. Все растворы исследовали в Трис-НСl буфере (1 М, pH 7,3) производства Sigma (индекс рефракции буферированной воды 1,356). Сперва готовили Трис-буфер, который затем использовали для приготовления первичных растворов БСА, ДТАБ и 2ГПβЦД. Образцы готовили путем смешения первичных растворов в различных пропорциях. Варьировали молярные соотношения ДТАБ:БСА (от 1 до 1000) и 2ГПβЦД:ДТАБ (от 0,5 до 10). Концентрация БСА составляла 1 г/л (0,015 мМ) во всех образцах. Объем каждого образца составлял 5 мл.

Динамическое рассеяние света. Для определения размера макромолекул БСА и их ассоциатов с ПАВ использовали метод динамического рассеяния света (ДРС). Средний размер частиц определяли на анализаторе размера частиц и дзета-потенциала

Malvern серии Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания), оснащенный гелий-неоновым лазером (633 нм, 4 мВт). Детектор обратного рассеянного излучения располагался под углом 173° . Измерения производились в полистирольной кювете объемом 1 мл. В каждом эксперименте проводилось 3 измерения, результаты усреднялись. При анализе автокорреляционной функции использовали приближение твердых сферических частиц. Графическую интерпретацию результатов измерения получали с помощью программного обеспечения «DTS Application Software» (Malvern Instruments). Ошибка измерений размера частиц $\pm 2\%$ [15].

Электрофорез (электрофоретическое рассеяние света). Измерения ζ -потенциала проводили с помощью лазерного доплеровского электрофореза в электрофоретической ячейке анализатора Malvern Zetasizer Nano-ZS с применением технологии M3-PALS (использование быстро и медленно переменного электрического поля наряду с фазовым и частотным анализом рассеянного света). Ошибка измерений ζ -потенциала частиц ± 0.12 (мкм·см)/(В·с⁻¹) [15].

Флуоресцентная спектрофотометрия. Измерения флуоресценции триптофана БСА проводили с помощью сканирующего двухлучевого спектрофотометра «Lambda 35» [16]. Возбуждение производилось при длине волны 280 нм. Спектр люминесценции записывался в диапазоне длин волн 300-450 нм. Измерения производились в кварцевой кювете объемом 3 мл.

Все измерения производились при температуре 25°C.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим, что происходит при добавлении 2ГПβЦД к смеси ДТАБ с БСА.

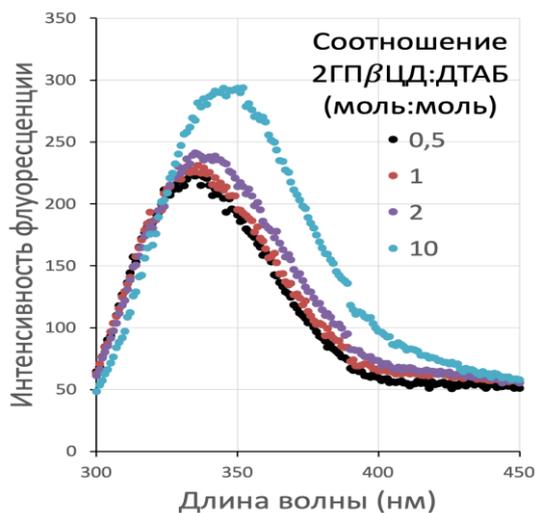


Рис. 2 – Спектры флуоресценции аминокислотного остатка триптофана (Trp) в БСА (0,015 ммоль/л) в смеси с ДТАБ (1,5 ммоль/л) и с 2ГПβЦД при различных мольных соотношениях 2ГПβЦД /ДТАБ = 0,5 (черные точки); 1 (красные точки); 2 (фиолетовые точки) и 10 (голубые точки). Длина волны возбуждения $\lambda=280$ нм

Fig. 2 – Fluorescence spectra of the amino acid residue tryptophan Trp in BSA (0.015 mmol/L) mixed with DTAB (1.5 mmol/L) and with 2GPβCD at different molar ratios of 2GPβCD/DTAB = 0.5 (black dots); 1 (red dots); 2 (purple dots) and 10 (blue dots). Excitation wavelength $\lambda=280$ nm

Данные рисунка 2 демонстрируют, что при увеличении соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ наблюдается сдвиг максимума флуоресценции триптофана в длинноволновую область с сопутствующим повышением интенсивности его флуоресценции.

При десятикратном избытке 2ГПβЦД над ДТАБ максимум флуоресценции приходится на 348 нм. При этой же длине волны наблюдается максимум флуоресценции триптофана в отсутствие ДТАБ, то есть в системе БСА-2ГПβЦД с идентичными концентрациями белка и циклодекстрина, что и в смесях с ДТАБ. Можно отметить, что уровни интенсивностей флуоресценции в обоих случаях так же совпадают (сравните кривую для соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ=10 на рис. 2 с кривой для соотношения 2ГПβЦД:БСА=1000 на рис. 3).

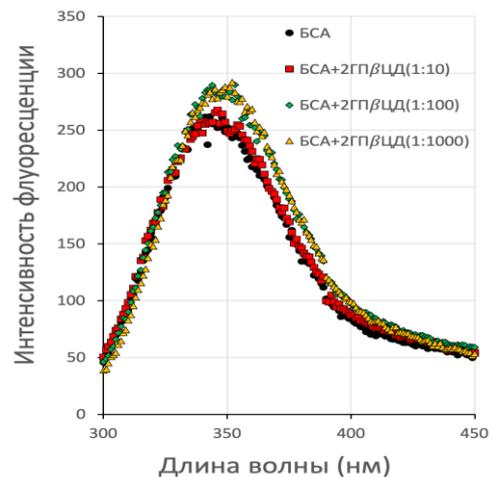


Рис. 3 – Спектры флуоресценции аминокислотного остатка триптофана Trp в БСА (0,015 ммоль/л) в смеси с ДТАБ (1,5 ммоль/л) и с 2ГПβЦД при различных мольных соотношениях 2ГПβЦД /ДТАБ = 0,5 (черные точки); 1 (красные точки); 2 (фиолетовые точки) и 10 (голубые точки). Длина волны возбуждения $\lambda=280$ нм

Fig. 3 – Fluorescence spectra of the amino acid residue tryptophan (Trp) in BSA (0.015 mmol/L) mixed with DTAB (1.5 mmol/L) and with 2GPβCD at different molar ratios of 2GPβCD/DTAB = 0.5 (black dots); 1 (red dots); 2 (purple dots) and 10 (blue dots). Excitation wavelength $\lambda=280$ nm

Ранее мы показали [17], что по мере связывания отрицательно заряженным трис-стабилизированным глобулярным белком катионов додецилтриметиламмония (ДТА) макромолекулы БСА гидрофобизируются (согласно сдвигу максимума флуоресценции триптофана в коротковолновую область с сопутствующим снижением интенсивности флуоресценции), сжимаются до 7 нм (согласно данным динамического рассеяния света) и нейтрализуются (согласно измерениям дзета-потенциала доплеровским электрофорезом). При достижении изоэлектрического состояния нейтрализованные и гидрофобизированные глобулы агрегируют друг с другом с образованием димеров и тримеров [17]. В мицеллярных растворах ПАВ основная масса (99,7 %) глобулярных ассоциатов БСА-

ДТА несет избыточный положительный заряд, набухая при этом до 10 нм. Оставшиеся 0,3% частиц достигают 20 нм размеров.

Как известно, 2ГПβЦД в смеси с ДТАБ в воде образует комплекс включения (соединение типа гость-хозяин), в результате чего углеводородный хвост молекулы ПАВ оказывается дегидрофобизированным. Гидрофобные свойства ПАВ при этом ослабевают, а мицеллы ПАВ теряют устойчивость и в водных средах зачастую распадаются на мономеры (рис. 4).

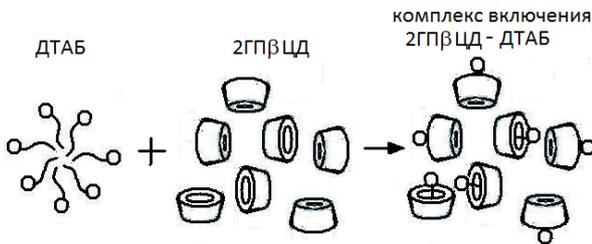


Рис. 4 – Схематическое представление распада мицеллы ДТАБ при добавлении 2ГПβЦД в результате образования комплекса включения, приводящего к дегидрофобизации углеводородных хвостов ПАВ

Fig. 4 – Schematic representation of the disintegration of a DTAB micelle upon the addition of 2HPβCD as a result of the formation of an inclusion complex, leading to the dehydrophobization of the hydrocarbon tails of the surfactant

Таким образом, сдвиг максимума длины волны эмиссии Trp в длинноволновую область с сопутствующим повышением интенсивности флуоресценции может быть следствием дегидрофобизации окружения триптофана вызванной дегидрофобизацией углеводородного хвоста ПАВ и распадом внутримакромолекулярных мицеллоподобных кластеров молекул ДТАБ. Распад таких кластеров может сопровождаться выбросом катионов ДТА из объема макромолекулы белка в объем раствора, что в свою очередь должно вызвать снижение заряда ассоциатов БСА-ДТА. Рассмотрим, что происходит с дзета-потенциалом этих частиц при добавлении 2ГПβЦД в систему (рис. 5 и 6).

Действительно, ожидаемое снижение дзета-потенциала с увеличением соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ наблюдается для систем, где концентрация ДТАБ составляет 1,5 ммоль/л (домицеллярный раствор ПАВ с соотношением ПАВ/БСА = 100) и 15 ммоль/л (мицеллярный раствор ПАВ с соотношением ПАВ/БСА = 1000). Из рисунков 5 и 6 видно, что в этих растворах в присутствии 2ГПβЦД дзета-потенциал ниже, чем без него. Иное поведение электрокинетического потенциала частиц наблюдается в системах с концентрацией ПАВ 0,015 ммоль/л и 0,15 ммоль/л (соотношение ПАВ/БСА = 1 и 10, соответственно). Здесь дзета-потенциал ассоциатов ДТА-БСА в присутствии 2ГПβЦД выше, чем без 2ГПβЦД. Кроме того, при низких концентрациях ПАВ величина дзета-потенциала ассоциатов ДТА-БСА-2ГПβЦД слабо зависит от соотношения 2ГПβЦД /ПАВ.

Из многочисленных исследований взаимодействия БСА с ионогенными ПАВ [18-23] известно, что при pH далеких от изоэлектрической точки при низких концентрациях ПАВ связывание мономеров ПАВ макромолекулой

белка обеспечивается ион-ионным взаимодействием ПАВ с противоположно заряженной группой белка, в то время как при высоких концентрациях ПАВ определяющий вклад в связывание ПАВ-белок вносят гидрофобные взаимодействия. Не трудно догадаться, что выявленное в нашем исследовании поведение электрокинетического потенциала частиц легко объясняется разрушающим действием циклодекстрина на гидрофобное связывание ДТАБ-БСА. Далее рассмотрим, как сказывается присутствие циклодекстрина на размерах ассоциатов ПАВ-белок.

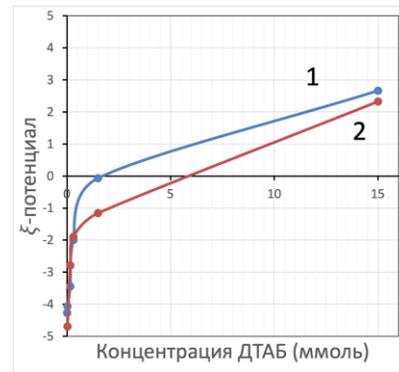


Рис. 5 – Зависимость дзета-потенциала частиц дисперсной фазы от концентрации ДТАБ в системах ДТАБ:БСА в отсутствие (1) и при добавлении 2ГПβЦД (2)

Fig. 5 – Dependence of the zeta potential of dispersed phase particles on the concentration of DTAB in DTAB:BSA systems in the absence (1) and with the addition of 2HPβCD (2)

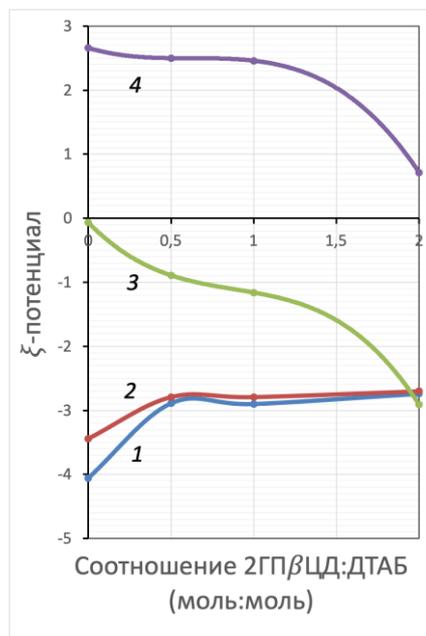


Рис. 6 – Зависимости дзета потенциала частиц от соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ в трис-буферированных растворах БСА (0,015 ммоль/л) при концентрациях ДТАБ в системе 0,015 (1), 0,15 (2), 1,5 (3) и 15 ммоль/л (4)

Fig. 6 – Dependence of the zeta potential of particles on the ratio of 2HPβCD:DTAB in Tris-buffered BSA solutions (0.015 mmol/L) at DTAB concentrations in the system of 0.015 (1), 0.15 (2), 1.5 (3), and 15 mmol/L (4)

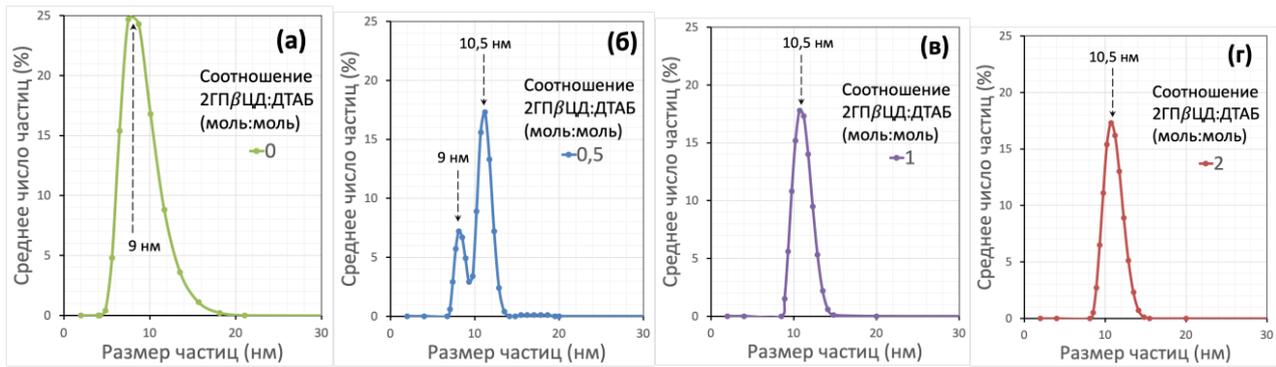


Рис. 7 – Кривые распределения частиц по размерам в трис-буферированных (pH=7,3) водных растворах 0,015 ммоль БСА в присутствии 0,015 ммоль ДТАБ и различных концентрациях 2ГПβЦД. Мольное соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ: 0 (а), 0,5 (б), 1 (в) и 2 (г)

Fig. 7 – Particle size distribution curves in Tris-buffered (pH=7.3) aqueous solutions of 0.015 mmol BSA in the presence of 0.015 mmol DTAB and various concentrations of 2HPβCD. Molar ratio of 2HPβCD:DTAB: 0 (a), 0.5 (b), 1 (c), and 2 (d)

В зависимости от концентрации ПАВ в системе наблюдаются три разные картины изменения размера частиц под влиянием циклодекстрина.

На рис. 7 а-г показана эволюция кривой распределения по размеру при изменении соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ, характерная для систем с низкой концентрацией ДТАБ (не превышающей 0,15 ммоль/л). Если до добавления циклодекстрина белковая глобула находится в сжатом до 9 нм состоянии (Рис. 7 а), то добавление циклодекстрина вызывает появление частиц размером 10,5 нм (рис. 7 б). Бимодальное распределение по размеру частиц наблюдается при всех соотношениях 2ГПβЦД:ДТАБ < 1. Причем, по мере добавления 2ГПβЦД интенсивность левого пика снижается, а правого пика растет. Когда соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ становится равным 1 распределение становится мономодальным (рис. 7 в), остается один пик на 10,5 нм. При дальнейшем увеличении соотношения 2ГПβЦД:ДТАБ кривая перестает эволюционировать (рис. 7 г). Таким образом, когда количество молекул циклодекстрина становится равным или превышает количество молекул ПАВ в системе, размер частиц перестает зависеть от соотношения циклодекстрин/ПАВ, оставаясь практически равным размеру нативного белка, стабилизированного трис-буфером.

Картина измененной размера частиц, когда в отсутствие циклодекстрина ассоциаты белок-ПАВ находятся в изоэлектрическом состоянии с характерным тримодальным распределением по размеру, показана на рис. 8. В этом случае при добавлении циклодекстрина распределение становится сперва бимодальным (соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ = 0.5 на рис. 8), а затем, когда соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ достигает 1, мономодальным. При избытке молекул циклодекстрина (соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ = 2 на рис. 8) размер частиц перестает меняться и соответствует размеру нативного трис-стабилизированного белка.

И, наконец, третий вариант изменения размера частиц наблюдается, когда концентрация ПАВ в системе превышает ККМ и в системе сосуществуют частицы двух размеров (10 нм и 20 нм). В этом случае, при добавлении циклодекстрина происходит сдвиг обеих мод (рис. 9) в сторону меньших значений (к 9 нм и к 18 нм, соответственно). При

этом соотношении интенсивностей постепенно изменяется в пользу частиц меньшего размера.

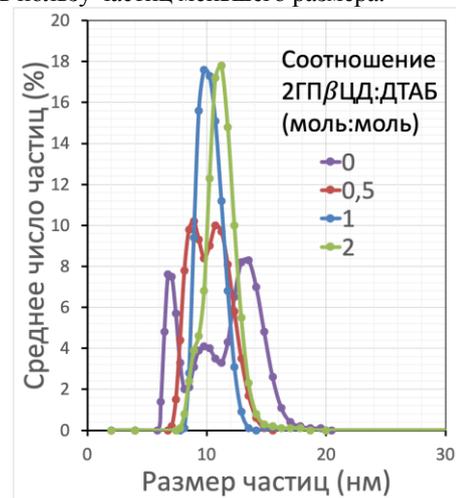


Рис. 8 – Кривые распределения частиц по размерам в трис-буферированных (pH=7,3) водных растворах 0,015 ммоль БСА в присутствии 1,5 ммоль ДТАБ и различных концентрациях 2ГПβЦД. Мольное соотношение 2ГПβЦД:ДТАБ: 0 (фиолетовая), 0,5 (красная), 1 (синяя) и 2 (зеленая)

Fig. 8 – Particle size distribution curves in Tris-buffered (pH=7.3) aqueous solutions of 0.015 mmol BSA in the presence of 1.5 mmol DTAB and various concentrations of 2HPβCD. Molar ratio of 2HPβCD:DTAB: 0 (purple), 0.5 (red), 1 (blue), and 2 (green)

Таким образом, в мицеллярном растворе, добавление циклодекстрина в систему приводит к компактизации, что само по себе не ново и качественно совпадает с данными, полученными ранее для водных небуферированных растворов БСА и растворов БСА буферированных фосфатным буфером (Na₂HPO₄-KH₂PO₄) или несколькими распространенными в биологии нейтральными pH-буферами на основе аминов, включая TES, TAPS, TAPSO, CAPSO и CHES. Отличительной особенностью наших наблюдений является то, что при низких концентрациях ПАВ трис-стабилизированный глобулярный белок,

гидрофобизируясь при связывании мономеров ПАВ, компактируется, а не расправляется (как предполагалось ранее при исследовании более концентрированных или не трис-стабилизированных систем), и добавление 2ГПВЦД в этих условиях приводит не к компактизации (как в мицеллярных растворах ПАВ), а к набуханию глобул до размеров нативного трис-стабилизированного белка.

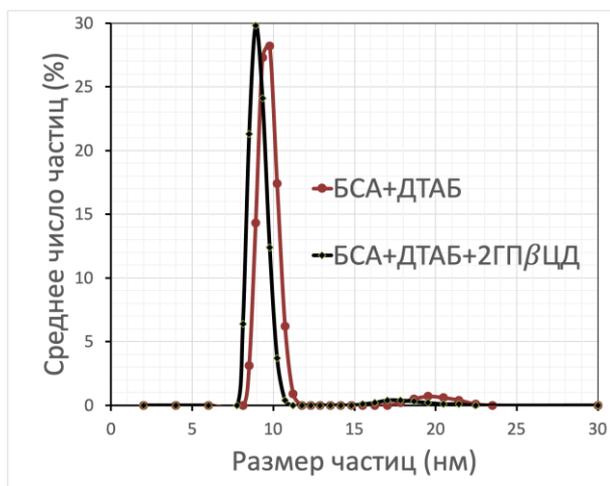


Рис. 9 – Кривые распределения частиц по размерам в трис-буферированных (pH=7,3) водных растворах 0,015 ммоль БСА в смеси с 15 ммоль ДТАБ в отсутствие (красная) и присутствии (черная) 15 ммоль 2ГПВЦД

Fig. 9 – Particle size distribution curves in Tris-buffered (pH=7.3) aqueous solutions of 0,015 mmol BSA mixed with 15 mmol DTAB in the absence (red) and presence (black) of 15 mmol 2HPBCD

Добавление 2ГПВЦД в систему ПАВ-белок позволяет лучше проявить относительный вклад различных типов взаимодействий в конформационное состояние и электрокинетический потенциал глобулярного белка и, тем самым, нарисовать общую картину явлений происходящих в системе циклодекстрин-ПАВ-белок, которая представлена на рис. 10.

Заключение

2ГПВЦД, как и другие циклодекстрины, образует с одноцепочечным ПАВ стехиометрический комплекс типа гость-хозяин, поэтому при добавлении 2ГПВЦД в систему БСА-ДТАБ здесь проявляется стехиометрия 2ГПВЦД :ДТАБ.

В системах с концентрацией ПАВ, 0,015 ммоль/л и 0,15 ммоль/л (соотношение ПАВ/БСА = 1 и 10, соответственно), где преобладающий вклад вносит ион-ионное связывание ПАВ-белок и за сжатие глобулы отвечает гидрофобное взаимодействие между углеводородными хвостами катионов ДТА электростатически связанных с анионами α -спиралей белка, циклодекстрин разру-

шает мостики из гидрофобных хвостов ДТА, стягивающие две отдельные α -спирали друг с другом, что приводит к набуханию глобулы белка. Возможно, это набухание делает более доступным проникновение катионов ДТА из объема раствора к анионным карбоксильным группам БСА внутри глобулы и ион-ионное связывание ПАВ-белок усиливается, приводя к смещению электрокинетического потенциала частиц в сторону более положительных значений с увеличением соотношения 2ГПВЦД:ДТАБ.

В системах с высокой концентрацией ПАВ (1,5 и 15 ммоль/л), где велик вклад гидрофобного связывания ПАВ, как гидрофобными фрагментами БСА так углеводородными хвостами уже связанного белком ДТА, дегидрофобизация углеводородного хвоста ПАВ циклодекстрином способствует высвобождению значительной части гидрофобно связанных катионов ДТА в объем раствора, приводя к смещению электрокинетического потенциала частиц в сторону более отрицательных значений с увеличением соотношения 2ГПВЦД:ДТАБ. Если в системе ассоциаты БСА-ДТА находились в сжатом изоэлектрическом состоянии с нарушенной агрегативной устойчивостью ($\xi=0$, [ДТАБ]=1,5 ммоль/л, соотношение ПАВ/БСА = 100), то выход ранее связанных катионов ДТА в объем раствора сопровождается восстановлением отрицательного заряда, набуханием и возвращением агрегативной устойчивости глобулярных ассоциатов БСА-ДТА. Помимо восстановления электростатического фактора агрегативной устойчивости распаду димеров и тримеров также может способствовать то, что циклодекстрин разрушает мостичные связи из гидрофобных хвостов ДТА, стягивающие две отдельные глобулы друг с другом. Эти мостичные связи возникают при сближении ионных пар карбоксильная группа БСА-катион ДТА, находящихся на поверхности нейтрализованных глобул.

В мицеллярной системе (15 ммоль/л, соотношение ПАВ/БСА = 1000) где сильна конкуренция гидрофобного стягивания и электростатического отталкивания между внутримакромолекулярными мицеллоподобными агрегатами ПАВ ассоциаты БСА-ДТАБ не теряют до конца избыточное положительное значение электрокинетического потенциала ($\xi>0$) даже при соотношениях 2ГПВЦД:ДТАБ = 2. Скорее всего, циклодекстрин лишь частично дегидрофобизирует углеводородный хвост молекулы ПАВ и связанные с белком внутримакромолекулярные кластеры ПАВ разрушаются не до конца даже при двукратном избытке циклодекстрина над количеством ПАВ в системе. Можно предположить, что частичная утрата внутримакромолекулярных мицеллоподобных кластеров ПАВ, ответственных за набухание белковой глобулы из-за их электростатического отталкивания приводит к слабому поджатию макромолекулы белка при добавлении циклодекстрина в мицеллярную систему БСА-ДТАБ.

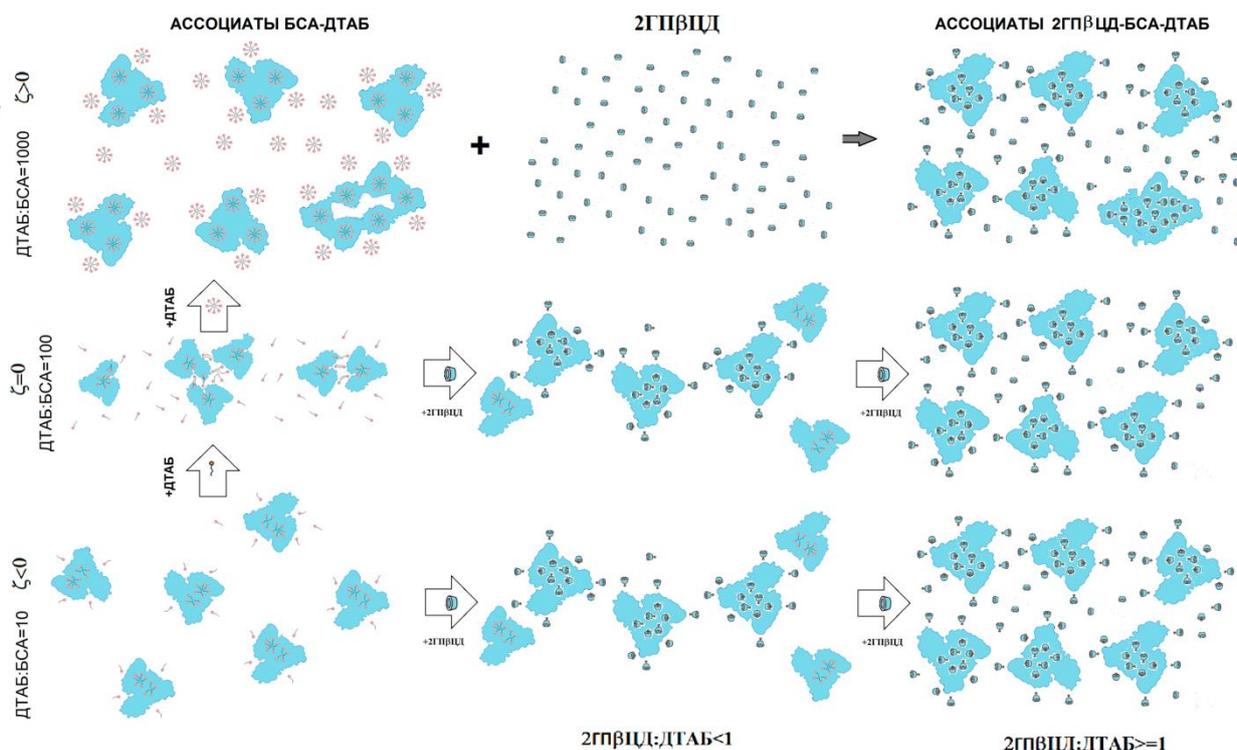


Рис. 10 – Поведение белковых глобул (трис-буферированный 0,015 ммоль/л БСА, pH=7,3) ассоциированных с катионным ПАВ (DTAB) при добавлении циклодекстрина (2HPβCD) в системы, отличающиеся концентрацией катионного ПАВ: 0,15; 1,5; 15 ммоль/л

Fig. 10 – Behavior of protein globules (Tris-buffered 0,015 mmol/L BSA, pH=7.3) associated with a cationic surfactant (DTAB) upon addition of cyclodextrin (2HPβCD) to systems differing in the concentration of the cationic surfactant (0,15; 1,5; 15 mmol/L)

Литература

- Jao D, Xue Y, Medina J, Hu X. Protein-Based Drug-Delivery Materials. *Materials* (Basel). 2017, 10(5):517. doi: 10.3390/ma10050517. PMID: 28772877; PMCID: PMC5459032.
- U. Anand, S. Mukherjee, Reversibility in protein folding: effect of β -cyclodextrin on bovine serum albumin unfolded by sodium dodecyl sulphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, 9375–9383.
- K. M. McGrath, Phase Behavior of Dodecyltrimethylammonium Bromide/Water Mixtures, *Langmuir* 1995, 11, 5, 1835–1839.
- M. A. Bahri, M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, A. Seret, Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by Electron Spin Resonance. *Colloids Surf A*, 2006, 290, 206–212.
- J. Carlstedt, A. Bilalov, E. Krivtsova, U. Olsson, B. Lindman, Cyclodextrin–Surfactant Coassembly Depends on the Cyclodextrin Ability To Crystallize, *Langmuir*, 2012, 28, 2387–2394.
- A. Bilalov, J. Carlstedt, E. Krivtsova, B. Lindman, U. Olsson, DNA with amphiphilic counterions: tuning colloidal DNA with cyclodextrin, *Soft Matter*, 2012, 8, 4988–4994.
- B. Gonzalez-Perez A., Carlstedt J., Dias R. S., Lindman B., *Colloids Surf. B*, 2010, 76, 20–27.
- Carlstedt J., Gonzalez-Perez A., Alatorre-Meda M., Dias R. S., Lindman B., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2010, 46, 153–158.
- L. Wang, J. Yan, Y. Li, K. Xu, S. Li, P. Tang, H. Li, The influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, dissolution, cytotoxicity, and binding of riluzole with human serum albumin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, V.117, 453–463.
- Kim JS, Choi YJ, Woo MR, Cheon S, Ji SH, Im D, Ud Din F, Kim JO, Youn YS, Oh KT, Lim SJ, Jin SG, Choi HG. New potential application of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solid self-nanoemulsifying drug delivery system and solid dispersion. *Carbohydr Polym.*, 2021, 1, 271, 118433.
- Liza M, Romero JR, Chico Y, Fresnedo O, Ochoa B. Application of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the assay of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and neutral and acid cholesterol ester hydrolases. *Lipids*. 1996, 31(3), 323–329. doi: 10.1007/BF02529879.
- Yokoo M., Kubota Y., Motoyama K., Higashi T., Taniyoshi M., Tokumaru H., et al. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLOS ONE*, 2015, 10(11): e0141946. doi:10.1371/journal.pone.0141946.
- S. K. Kim, C-H. Yun, S. H. Han, Induction of dendritic cell maturation and activation by a potential adjuvant, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Frontiers in Immunology*, 2016, V.7, 435–445.
- V.B. Bezerra et al. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-BCD) inhibits SARS-CoV-2 replication and virus-induced inflammatory cytokines, *Antiviral Research*, 2022, 205, 105373.
- В. Е. Проскурина, Е. С. Кашина, А. П. Рахматуллина, Седиментация суспензии диоксида титана магнитными флокулянтами, *Коллоидный журнал*, 2023, Т. 85, No 1, 77–84.
- Сагдеев Д.О., Шамилов Р.П., Воронкова В.К., Суханов А.А., Галяметдинов Ю.Г. Люминесценция и парамагнитные свойства квантовых точек CdS, легированных ионами лантаноидов, *Известия АН. Сер. Хим.* 2020, 9, 1749.
- Диденко Е.В., Билалов А.В. Конформационное поведение трис-стабилизированного бычьего сывороточного альбумина при взаимодействии с катионным

- ПАВ. Вестник технологического университета. 2026, Т.29, №1, С. 11-17.
18. Харлов А. Е., Анищук А. Н., Деркач С. Р., Левачев С. М., Закономерности взаимодействия бычьего сывороточного альбумина с дифильными молекулами. Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления, Т.3, № 38, С. 81-89.
 19. Nozaki Y., Reynolds J. A., Tanford C., The Interaction of a Cationic Detergent with Bovine Serum Albumin and Other Proteins, *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 4452-4459.
 20. Turro N. J., Lei X.-G., Ananthapadmanabhan K. P., Aronson M., Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System, *Langmuir*, 1995, 11, 2525-2533.
 21. Y. Li, X. Wang, Y. Wang, Comparative Studies on Interactions of Bovine Serum Albumin with Cationic Gemini and Single-Chain Surfactants, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 8499-8505.
 22. N. Kumar Das, L. Pawar, N. Kumar, S. Mukherjee, Quenching interaction of BSA with DTAB is dynamic in nature: A spectroscopic insight, *Chemical Physics Letters*, 2015, V. 635, 50-55.
 23. U. Anand, C. Jash, S. Mukherjee, Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein-surfactant assembly, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114 (48), 15839-15845.
 10. Kim JS, Choi YJ, Woo MR, Cheon S, Ji SH, Im D, Ud Din F, Kim JO, Youn YS, Oh KT, Lim SJ, Jin SG, Choi HG. New potential application of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solid self-nanoemulsifying drug delivery system and solid dispersion. *Carbohydr Polym.*, 2021, 1, 271, 118433.
 11. Liza M, Romero JR, Chico Y, Fresnedo O, Ochoa B. Application of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the assay of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and neutral and acid cholesterol ester hydrolases. *Lipids*. 1996, 31(3), 323-329. doi: 10.1007/BF02529879.
 12. Yokoo M., Kubota Y., Motoyama K., Higashi T., Taniyoshi M., Tokumaru H., et al. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLOS ONE*, 2015, 10(11): e0141946. doi:10.1371/journal.pone.0141946.
 13. S. K. Kim, C-H. Yun, S. H. Han, Induction of dendritic cell maturation and activation by a potential adjuvant, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Frontiers in Immunology*, 2016, V.7, 435-445.
 14. B.B. Bezerra et al. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-BCD) inhibits SARS-CoV-2 replication and virus-induced inflammatory cytokines, *Antiviral Research*, 2022, 205, 105373.
 15. V. E. Proskurina, E. S. Kashina, A. P. Rakhmatullina, Sedimentation of titanium dioxide suspension using magnetic flocculants, *Colloid Journal*, 2023, Vol. 85, No. 1, 77-84.
 16. Sagdeev D.O., Shamilov R.R., Voronkova V.K., Sukhanov A.A., Galyametdinov Yu.G. Lanthanide-doped CdS quantum dots: luminescence and paramagnetic properties. *Russian Chemical Bulletin*, 2020, 9, 1749.
 17. Didenko E.V., Bilalov A.V. Conformational behavior of tris-stabilized bovine serum albumin when interacting with cationic surfactant. *Herald of Technological University*. 2026, V.29, 1, 11-17.
 18. Kharlov A. E., Anishchuk A. N., Derkach S. R., Levachev S. M., Patterns of interaction between bovine serum albumin and diphilic molecules. *Bulletin of the East Siberian State University of Technology and Management*, Vol. 3, No. 38, pp. 81-89.
 19. Nozaki Y., Reynolds J. A., Tanford C., The Interaction of a Cationic Detergent with Bovine Serum Albumin and Other Proteins, *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 4452-4459.
 20. Turro N. J., Lei X.-G., Ananthapadmanabhan K. P., Aronson M., Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant Interactions: The BSA/SDS System, *Langmuir*, 1995, 11, 2525-2533.
 21. Y. Li, X. Wang, Y. Wang, Comparative Studies on Interactions of Bovine Serum Albumin with Cationic Gemini and Single-Chain Surfactants, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 8499-8505.
 22. N. Kumar Das, L. Pawar, N. Kumar, S. Mukherjee, Quenching interaction of BSA with DTAB is dynamic in nature: A spectroscopic insight, *Chemical Physics Letters*, 2015, V. 635, 50-55.
 23. U. Anand, C. Jash, S. Mukherjee, Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein-surfactant assembly, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114 (48), 15839-15845.

References

1. Jao D, Xue Y, Medina J, Hu X. Protein-Based Drug-Delivery Materials. *Materials* (Basel). 2017, 10(5):517. doi: 10.3390/ma10050517. PMID: 28772877; PMCID: PMC5459032.
2. U. Anand, S. Mukherjee, Reversibility in protein folding: effect of β -cyclodextrin on bovine serum albumin unfolded by sodium dodecyl sulphate. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, 9375-9383.
3. K. M. McGrath, Phase Behavior of Dodecyltrimethylammonium Bromide/Water Mixtures, *Langmuir* 1995, 11, 5, 1835-1839.
4. M. A. Bahri, M. Hoebeke, A. Grammenos, L. Delanaye, N. Vandewalle, A. Seret, Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by Electron Spin Resonance. *Colloids Surf A*, 2006, 290, 206-212.
5. J. Carlstedt, A. Bilalov, E. Krivtsova, U. Olsson, B. Lindman, Cyclodextrin-Surfactant Coassembly Depends on the Cyclodextrin Ability To Crystallize, *Langmuir*, 2012, 28, 2387-2394.
6. A. Bilalov, J. Carlstedt, E. Krivtsova, B. Lindman, U. Olsson, DNA with amphiphilic counterions: tuning colloidal DNA with cyclodextrin, *Soft Matter*, 2012, 8, 4988-4994.
7. B. Gonzalez-Perez A., Carlstedt J., Dias R. S., Lindman B., *Colloids Surf. B*, 2010, 76, 20-27.
8. Carlstedt J., Gonzalez-Perez A., Alatorre-Meda M., Dias R. S., Lindman B., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2010, 46, 153-158.
9. L. Wang, J. Yan, Y. Li, K. Xu, S. Li, P. Tang, H. Li, The influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the solubility, dissolution, cytotoxicity, and binding of riluzole with human serum albumin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, V.117, 453-463.

© **Е. В. Диденко** – магистр, Казанский национальный исследовательский технологический университет (КНИТУ), Казань, Россия; **А. В. Билалов** – док. хим. наук, профессор кафедры Физической и коллоидной химии, КНИТУ, azus2004@bk.ru.

© **E. V. Didenko** – Master-student, Kazan National Research Technological University (KNRTU), Kazan, Russia; **A. V. Bilalov** – Doctor of Sciences (Chemical Sci.), Professor at the department of Physical and Colloid Chemistry, KNRTU, azus2004@bk.ru.

Дата поступления рукописи в редакцию – 31.01.26.

Дата принятия рукописи в печать – 05.02.26.