

Гликирование альбумина *in vitro* при нормальной и повышенной концентрации глюкозы

Лотош Н.Ю.¹, Савельев С.В.^{1,3}, Селищева А.А.^{1,2}

¹ — АНО «Институт биомедицинских проблем», Москва, Россия

² — Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

³ — ФГБНУ «Институт морфологии человека», Москва, Россия

Альбумин — основной белок плазмы, в крови подвержен реакциям гликирования и окисления. При гликировании к остаткам лизина и аргинина присоединяются остатки глюкозы. Окислению подвержены как различные аминокислотные остатки в молекуле альбумина, так и свободная SH-группа в положении Cys 34. При диабете гликирование и окисление молекулы альбумина происходит в большей степени, чем в норме. В настоящем исследовании изучали *in vitro* влияние окисления SH-групп в молекуле человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) на его гликирование при нормальной и высокой концентрациях глюкозы (5 мМ и 50 мМ). Выяснили, что тушение флуоресценции триптофана происходит только при содержании кетоамина, характерном для хронической гипергликемии (свыше 0,4 М/М). Также обнаружили, что альбумин гликируется в большей степени, если тиоловый пул альбумина снижен, т.е. SH-группы частично окислены.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, кетоамин, меркаптальбумин, немеркаптальбумин, сахарный диабет 1-го типа, человеческий сывороточный альбумин

Введение

Молекулярная масса альбумина около 66 кДа, концентрация в крови около 600 мкМ (35—50 мг/мл), что составляет большую часть всех плазменных белков (примерно 60%). Альбумин поддерживает онкотическое давление и рН, связывает и транспортирует эндогенные и экзогенные компоненты (ионы металлов, неэтерифицированные жирные кислоты, билирубин, лекарственные препараты) [5, 12]. Благодаря наличию единственной свободной SH-группы в положении Cys34 альбумин является антиоксидантом и формирует наибольший тиоловый пул в крови [11]. В плазме здоровых взрослых 70—80% альбумина содержит свободную сульфгидрильную группу и называется меркаптальбумином (human mercaptalbumin), 25% остатков цистеина Cys34 формируют дисульфиды с другими цистеинами, глутатионом или гомоцистеином, образуя немеркаптальбумин 1 (human nonmercaptalbumin 1). При окислении небольшого процента остатка Cys34 до сульфинового или сульфоновой кислотных форм образуется немеркаптальбумин 2 (human nonmercaptalbumin 2) [8]. При развитии некоторых патологий доля окисленных форм увеличивается [6].

В кровотоке альбумин подвергается гликированию и окислению. На первой стадии неферментативного гликирования карбоксильная группа глюкозы присоединяется к свободной ε-аминогруппе остатка лизина или аргинина с образованием основания Шиффа, затем происходит перегруппировка Амадори, при которой ОН-группа во втором положении остатка сахара окисляется до кетогруппы, образуя кетоамин, в связи с чем суммарная реакция называется «окислительным гликированием». Кетоамин (т.е. группа -CO-CH₂-NH-) количественно определяется цветной реакцией с тетразолием нитросиним [10]. Далее из продукта Амадори путем окисления, полимеризации и др. происходит необратимое образование конечных продуктов гликирования (КПГ): N_ε-карбоксиметиллизина, N_ε-карбоксиэтиллизина, пирралина, пентозидина и др. [15]. Через специфические рецепторы КПГ могут активировать воспалительный путь передачи сигнала, что приводит к повышению уровня провоспалительных цито-

кинов [13] и формированию таких патологий, как диабетическая нефропатия, нейропатия, ретинопатия, ревматоидный артрит, атеросклероз [3, 14].

Коммерческие препараты ЧСА различаются по количеству аминокислотных остатков, степени гликирования и окисления. Так, согласно работе [14], коммерческий альбумин изначально окислен, т.е. содержание SH-групп в нем снижено до 40%.

Целью настоящего исследования было изучение в условиях *in vitro* влияния окисления альбумина на процесс его гликирования при нормальной и повышенной концентрациях глюкозы (5 мМ и 50 мМ). Для этого использовали коммерческий ЧСА, в котором SH-группы изначально были частично окислены и тот же ЧСА, в котором SH-группы были восстановлены до нормальных физиологических значений.

Материалы и методы

Для получения ЧСА с различной степенью окисления использовали:

1) исходный коммерческий ЧСА, содержащий 40% сульфогрупп (Sigma, США, A1653), далее называемый *оксиальбумин*;

2) *меркаптальбумин*, в котором сульфогруппы были восстановлены до 70% инкубированием ЧСА (40 мг/мл) с дитиотреитолом (3 мМ) 30 мин. при 37°C. После восстановления ЧСА дитиотреитол удаляли диализом против фосфатно-солевого буфера);

3) *супероксиальбумин*, содержащий 20% сульфогрупп, полученный при окислении оксиальбумина перманганатом калия (1 мМ) в течение 72 ч при комнатной температуре.

Для получения ЧСА с различной степенью гликирования использовали оксиальбумин и меркаптальбумин (40 мг/мл), которые инкубировали с глюкозой (Cerestar Iberica, Испания) в концентрациях 0, 5 и 50 мМ в течение 3 недель в фосфатно-солевом буфере (1.47 мМ КН₂РO₄, 5,2 мМ Na₂НРO₄, 45 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, азид натрия 0,05%; рН 7.4) при 37°C. Для получения препарата белка

SH- и карбонильные группы в оксиальбумине и меркаптальбумине в присутствии и отсутствие глюкозы

Препарат	Условия гликирования (концентрация глюкозы)	SH-группы, М/М белка. Время инкубации (недели)			Карбонильные группы, М/М белка. Время инкубации (недели)		
		1	2	3	1	2	3
Оксиальбумин	0 мМ	0,28	0,23	0,12	0,22	0,21	0,19
	5 мМ	0,30	0,28	0,25	0,26	0,29	0,25
	50 мМ	0,31	0,34	0,28	0,23	0,31	0,16
Меркаптальбумин	0 мМ	0,54	0,74	0,62	0,28	0,27	0,22
	5 мМ	0,78	0,89	0,69	0,27	0,25	0,24
	50 мМ	0,68	0,79	0,70	0,24	0,21	0,18

с высокой степенью гликирования оксиальбумин (20 мг/мл) инкубировали с 1,6 М глюкозой в тех же условиях. Из реакционной смеси после инкубации в течение 1, 2 и 3 недель отбирали аликвоты и диализовали против фосфатно-солевого буфера в течение 12 часов, в трех сменах буфера для удаления несвязавшейся глюкозы. Растворы хранили при -70°C .

Определение количества белка, кетоамина, SH-групп и карбонильных групп. Кетоамин определяли количественно с помощью колориметрического метода с использованием тетразолия нитросинего [10], калибровочную кривую строили с помощью калибратора кетоамина (полилизин с известным содержанием кетоамина) из коммерческого набора (Sentinel, Италия). Количество SH-групп определяли с помощью реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)) по методу [4]. Карбонильные производные определяли по методу [9] с помощью 2,4-динитрофенилгидразина. Количество белка определяли методом Бредфорда [2] и по оптической плотности при $\lambda = 280$ нм. Коэффициент экстинкции использовали $\zeta = 34445 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере «Anthos 2010» (Австрия) и на спектрофотометре «Cary» (США).

Спектр флуоресценции ЧСА и его гликированных форм определяли на флуориметре (Varian Cary Eclipse, США) при $\lambda_{\text{возбуждения}} = 285$, $\lambda_{\text{испускания}} = 290-500$ нм; концентрация белка во всех образцах была одинакова — 2 мг/мл.

Анализ различных препаратов ЧСА с помощью ВЭЖХ. Ионообменную хроматографию альбумина проводили на хроматографе Varian (США) с анионообменной колонкой Mini Q 4.6/50 PE (GE Healthcare Швейцария). В качестве подвижной фазы А использовали буфер, содержащий 0,04 М фосфорной кислоты и 0,04 М уксусной кислоты в соотношении 1:1. До pH 6,4 доводили 25% аммиаком. Подвижная фаза В содержала этот буфер и 1,0 М NaCl. Градиент 1 М NaCl по буферу А: 1 мин — 100%, 2 мин — 99,5%, 3 мин — 99,5%, 4 мин — 95%, 6 мин — 95%, 6,5 мин — 90%, 8 мин — 90%, 8,5 мин — 80%, 9,5 мин — 80%, 11 мин — 50%, 11,5 мин — 50%, 12,5 мин — 0%, 4 мин — 0%. Скорость потока 1,5 мл/мин. Белок регистрировали по флуоресценции при $\lambda_{\text{возбуждения}} = 285$ нм и $\lambda_{\text{испускания}} = 340$ нм и по поглощению при $\lambda = 280$ нм.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы оценить влияние тиолового пула альбумина на степень его гликирования, препараты ЧСА с различной степенью окисления SH-групп инкубировали с глюкозой. В работе использовали *оксиальбумин*, содержащий 0,4 М SH-групп на 1 молекулу белка и *меркапта-*

льбумин, тиоловый пул которого составил $0,67 \pm 0,1$ М SH-групп на 1 молекулу белка (далее М/М), что соответствует норме для здорового человека [11]. Данные препараты инкубировали без глюкозы или с глюкозой в концентрациях 5 и 50 мМ в течение 1, 2 и 3 недель (что соответствует биологической жизни альбумина), после чего в белке определяли содержание SH-, карбонильных групп и кетоамина. Как следует из данных, представленных в таблице, содержание тиоловых и карбонильных групп на 1 молекулу белка в обоих препаратах не претерпело заметных достоверных изменений. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что окислительной «мощи» глюкозы при данных условиях недостаточно для изменения этих показателей.

При определении кетоамина установили, что инкубация как оксиальбумина, так и меркаптальбумина в присутствии нормального уровня глюкозы (5,0 мМ) не приводит к увеличению содержания кетоамина. Стоит отметить, что исходный коммерческий препарат (оксиальбумин) изначально уже был гликирован, так как содержал около 0,2 М/М кетоамина, что согласуется с данными литературы о количестве кетоамина в альбумине в норме [7]. Можно предположить, что на начальном этапе гликирования, который происходит в кровотоке при нормальном содержании глюкозы, задействованы наиболее эффективные сайты связывания остатков аминокислот с глюкозой и дальнейшего связывания при этой концентрации глюкозы не происходит. Если учесть, что в молекуле альбумина содержится 59 остатков лизина и 24 — аргинина, то содержание 0,2 молекул кетоамина на молекулу выделенного из плазмы крови белка говорит о том, что

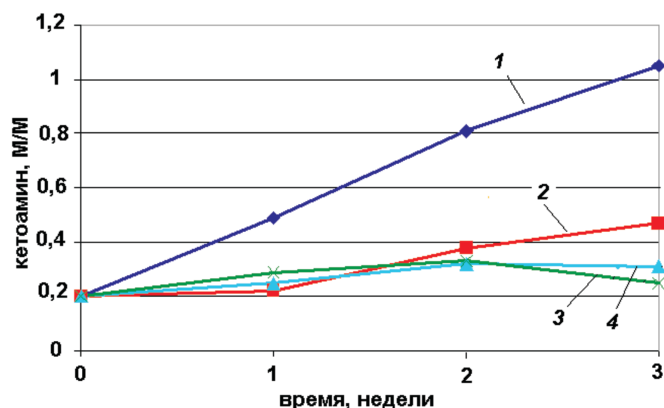


Рис. 1. Содержание кетоамина при инкубации альбумина с глюкозой во времени в зависимости от окисления SH-групп: 1, 2 — оксиальбумин и меркаптальбумин соответственно, инкубированные с 50 мМ глюкозы; 3, 4 — меркаптальбумин и оксиальбумин, инкубированные с 5,0 мМ глюкозы.

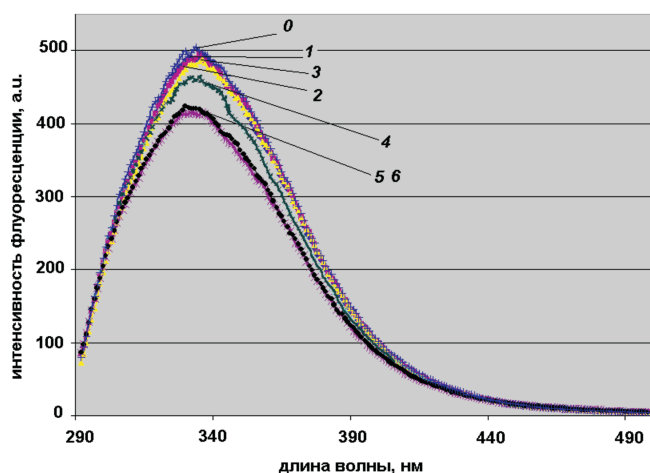


Рис. 2. Спектры флуоресценции исходного коммерческого ЧСА (оксиальбумина) и препаратов, инкубированных 3 недели с глюкозой и в ее отсутствие: 0 — не инкубированный оксиальбумин (контроль); 1, 2, 3 — меркаптальбумин, инкубированный с глюкозой в концентрациях 0, 5 и 50 мМ соответственно; 4, 5, 6 — оксиальбумин, инкубированный с глюкозой (0, 5 и 50 мМ соответственно).

в нормальных условиях очень небольшая часть возможных мест связывания занята глюкозой.

Однако в присутствии повышенного содержания глюкозы (50 мМ) содержание кетоамина возрастает во времени, причём в составе оксиальбумина обнаруживается большее количество кетоамина на протяжении всей инкубации, чем в меркаптальбумине: в первом случае содержание кетоамина возрастает с 0,5 М/М до 1,1 М/М, а во втором — с 0,2 М/М до 0,5 М/М. Наглядно изменение содержания кетоамина показано на рис. 1.

Чтобы оценить изменения в структуре альбумина при гликировании в нормальных и гипергликемических условиях, изучали специфическую флуоресценцию окси- и меркаптальбумина, инкубированных в присутствии 5 мМ и 50 мМ глюкозы. Спектры флуоресценции белков, инкубированных с глюкозой в течение 3 недель, показаны на рис. 2. Спектры флуоресценции белков, инкубированных с глюкозой в течение 1 и 2 недель, на рисунке не представлены, так как инкубирование этих препаратов не оказало существенного влияния на их флуоресценцию. Контролем служил коммерческий препарат альбумина (оксиальбумин), который растворяли в фосфатно-солевом буфере непосредственно перед экспериментом.

Видно, что на 3-й неделе инкубации белка без глюкозы происходит незначительное снижение интенсивности

флуоресценции оксиальбумина, в то время как интенсивность флуоресценции меркаптальбумина остается без каких-либо изменений. Более значимое различие наблюдается при инкубации окисленного белка в присутствии 5 и 50 мМ глюкозы.

При сопоставлении данных по содержанию кетоамина и интенсивности флуоресценции того же образца ЧСА можно сделать вывод, что присутствие 0,2—0,4 молекул кетоамина на молекулу белка не оказывает влияния на его структурную организацию, а при наличии в молекуле белка большего количества кетоамина (свыше 0,4 молекул на молекулу белка) происходит снижение интенсивности флуоресценции. Возможно, при таком количестве остатков глюкозы в молекуле белка снижение суммарного положительного заряда на ϵ -аминогруппе приводит к уменьшению содержания альфа-спиралей в белке, что обуславливает увеличение полярности окружения триптофана, регистрируемого по снижению интенсивности флуоресценции.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в исходном коммерческом препарате альбумина SH-группы частично окислены и содержится кетоамин. Для характеристики коммерческого ЧСА была применена анионообменная хроматография. Ранее Hayashi T. была предложена методика разделения ЧСА на фракции, содержащие SH-группы, и фракции, содержащие S-S связи и производные сульфокислот ($-\text{SO}_3\text{H}$), с помощью ионообменной хроматографии в градиенте этанола [8]. Нами была разработана методика, отличающаяся типом колонки и составом подвижной фазы.

Для оценки влияния степени окисления ЧСА на его разделение с помощью анионообменной хроматографии были проанализированы препараты ЧСА с различной степенью окисления SH-групп и одинаковой степенью гликирования (все препараты содержали кетоамин 0,2 М/М):

1. Меркаптальбумин (содержит 0,7 М/М SH-групп);
2. Оксиальбумин (содержит 0,4 М/М SH-групп);
3. Супероксиальбумин (содержит 0,2 М/М SH-групп).

На полученных хроматограммах (флуоресцентная детекция) присутствуют два основных пика (I и II) с временем удерживания 1—2 мин и 4—6 мин соответственно (рис. 3).

В зависимости от степени окисления сульфгидрильных групп (т.е. уменьшения их количества) уменьшается площадь первого пика (AI) и, соответственно, возрастает площадь второго пика (AII). Полученный результат позволяет предположить, что первый пик относится к восстановленной форме альбумина (меркаптальбумину), а второй — к его окисленной форме (немеркаптальбумину).

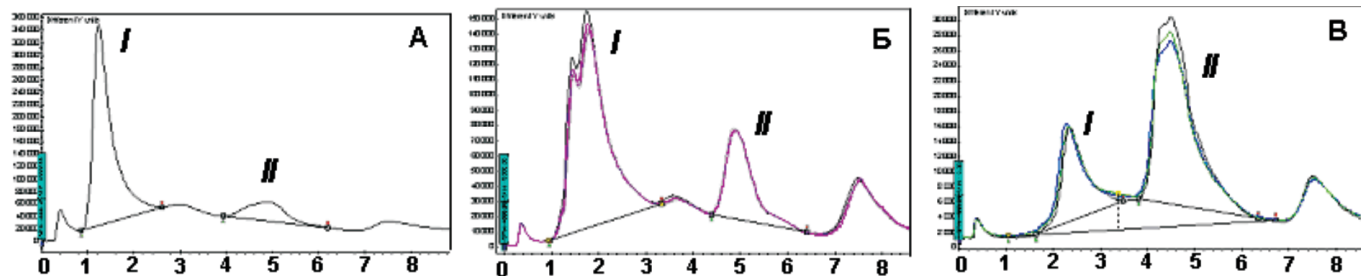


Рис. 3. Анионообменная ВЭЖХ препаратов ЧСА с различной степенью окисления и одинаковой степенью гликирования (0,2 М/М): А — меркаптальбумин; Б — оксиальбумин; В — супероксиальбумин; I, II — пики, отвечающие за «нормальную» и «изменённую» формы ЧСА соответственно.

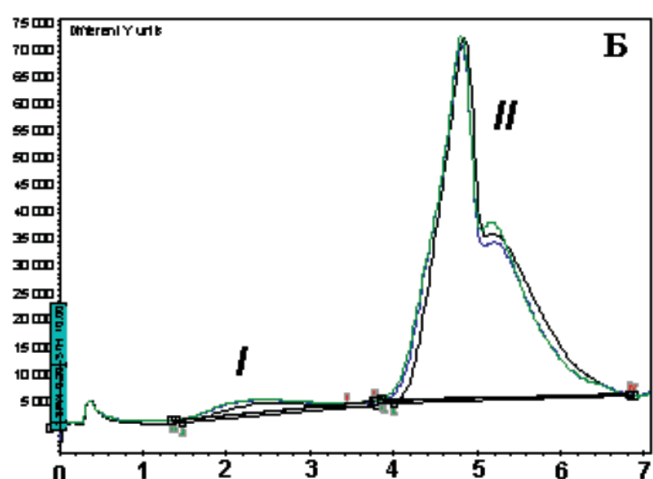
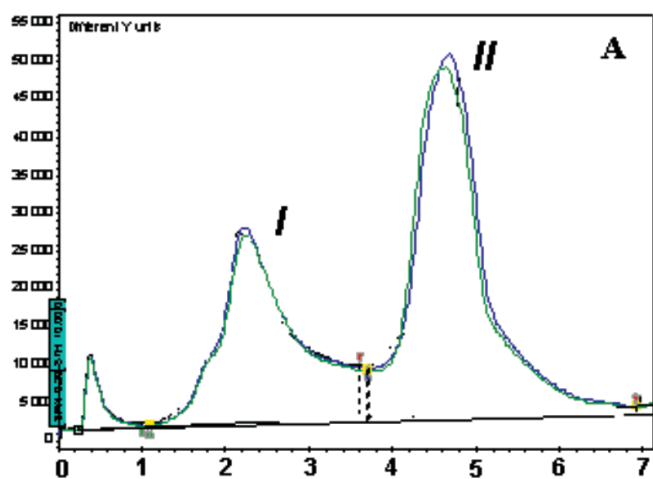


Рис. 4. Анионообменная ВЭЖХ препаратов ЧСА с различной степенью гликирования и одинаковой степенью окисления (0,4 М/М): А — оксиальбумин (кетоамин 1,5 М/М); Б — оксиальбумин (кетоамин 20 М/М); I, II — пики, отвечающие за «нормальную» и «изменённую» формы ЧСА соответственно.

Для оценки влияния степени гликирования ЧСА на его разделение с помощью анионообменной хроматографии исследовали два препарата белка, содержащих различное количество кетоамина (1,5 М/М и 20 М/М) и одинаковое количество SH-групп (0,4 М/М). Из хроматограмм, представленных на рис. 4, видно, что увеличение содержания кетоамина в молекуле белка приводит к увеличению площади пика, который соотносится с окисленной формой (пик II), в то время как содержание SH-групп остаётся неизменным.

Как уже отмечалось выше, гликирование протекает в основном по боковым NH_2 -группам остатков лизина и аргинина. Присоединение гидрофильного остатка глюкозы приводит к изменению гидрофобно-гидрофильного баланса белка и к уменьшению числа положительных зарядов. Это влияет на скорость прохождения через анионообменную колонку. Следовательно, метод анионообменной хроматографии разделяет не только белок с различным содержанием сульфогрупп, но и с различным числом зарядов на молекуле, обусловленных наличием свободных боковых групп аминокислот.

Итак, полученные с помощью анионообменной хроматографии пики I и II отражают глико-окислительное состояние альбумина, причём пик I представляет «нормальную» форму альбумина, а пик II — «изменённую». Исходя из этого, можно предположить, что коэффициент отношения площадей пиков ($\text{AreaI}/\text{AreaII}$, или AI/AII) можно рассматривать как параметр, отражающий глико-окислительное состояние альбумина (рис. 5). Числовые значения коэффициента AI/AII приведены в тексте подписи к рисунку.

Итак, из рис. 5 видно, что для меркаптальбумина, содержащего нормальные количества кетоамина и SH-групп, коэффициент AI/AII имеет самое высокое значение — 4,7, а для супероксиальбумина и сильногликированного альбумина — самые низкие — 0,5 и 0,06 соответственно. Причем первый содержит нормальное количество кетоамина и очень низкое — SH-групп, а второй — нефизиологическое количество кетоамина (20 М/М) и количество SH-групп, возможное при окислительном стрессе. Таким образом, коэффициент AI/AII представляет информацию об «общем» состоянии альбумина, подверженного как окислению, так и гликированию. В перспективе это направление может быть предложено для клинических исследований с целью оценки глико-окислительного состояния альбумина сыворотки крови.

Ранее в литературе были описаны результаты исследований структуры и свойств альбумина при определенной степени гликирования. Было показано гошение флуоресценции триптофана Trp-214 и сдвиг спектра флуоресценции в синюю область. С увеличением степени гликирования возрастало содержание карбонильных групп и в два раза снижалось количество тиоловых (с 0,6 М/М до 0,3 М/М), т.е. происходило окисление молекулы белка. Однако следует отметить, что обсуждаемые результаты относятся к белку с большим количеством кетоамина, равном 5–12 М/М белка [1, 12], в то время как у людей как в норме, так и при диабете этот показатель значительно ниже. Так, при выделении альбумина из сыворотки здоровых доноров с помощью полиэтиленгликоля и определении кетоамина с помощью ТНС были получены референсные значения 0,27–0,37 М кетоамина на 1 М белка, а у больных диабетом 0,5–0,8 М/М [10]. В данной работе учитывалось, что для изучения свойств альбумина *in vitro* в условиях гликирования необходимо восстанавливать содержание SH-групп до нормального значения (около 0,7 М/М).

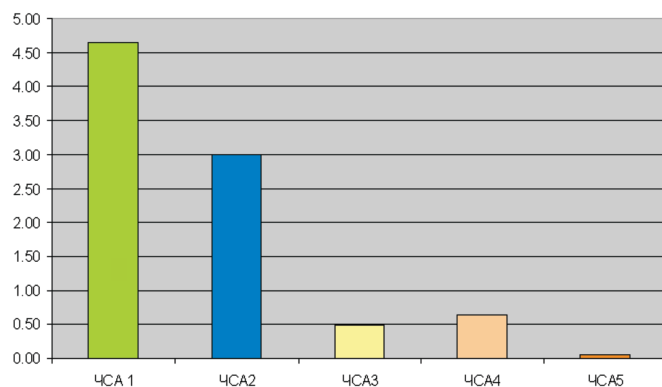


Рис. 5. Отношение площадей пиков AI/AII , полученных при анализе различных препаратов ЧСА методом анионообменной ВЭЖХ: ЧСА 1 — меркаптальбумин (кетоамин 0,2 М/М, SH-группы 0,7 М/М), $\text{AI}/\text{AII} = 4,70$; ЧСА 2 — оксиальбумин (коммерческий) (кетоамин 0,2 М/М, SH-группы 0,4 М/М), $\text{AI}/\text{AII} = 3,00$; ЧСА 3 — супероксиальбумин (кетоамин 0,2 М/М, SH-группы 0,2 М/М), $\text{AI}/\text{AII} = 0,50$; ЧСА 4 — гликированный оксиальбумин (кетоамин 1,5 М/М, SH-группы 0,4 М/М), $\text{AI}/\text{AII} = 0,65$; ЧСА 5 — гликированный оксиальбумин (кетоамин 20 М/М, SH-группы 0,4 М/М), $\text{AI}/\text{AII} = 0,06$.

Итак, было обнаружено, что исследуемые свойства альбумина начинают изменяться только при повышенном содержании кетоамина (свыше 0,4 М/М), характерном при хронической гипергликемии у человека, и не меняются при нормальном значении этого показателя. Также обнаружили, что такие свойства альбумина как снижение флуоресценции и образование кетоамина существеннее изменяются при гликировании, если изначально тиоловый пул альбумина снижен, т.е. SH-группы частично окислены. Следовательно, процессы окисления влияют на процессы гликирования.

Список литературы

1. Али Хан М.В., Рашид З., Али Хан В., Али Р. Биохимический, биофизический и термодинамический анализ сывороточного альбумина человека, гликированного *in vivo* // Биохимия. — 2007. — Т. 72. — Вып. 2. — С. 175–183.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — Мир, 1991. — 544 с.
3. Ahmad S., Moinuddin, Ali A. Immunological studies on glycosylated human IgG // *Life Sci.* — 2012. — Vol. 90. — P. 980–987.
4. Aitken A., Learmonth M. Quantification and location of disulfide bonds in proteins // *Methods Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 64. — P. 317–328.
5. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K.S., Wa C., Bolt E., Koke M., Hage D. S. Review: Glycation of human serum albumin // *Clin. Chim. Acta.* — 2013. — Vol. 425. — P. 64–76.
6. Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1247. — P. 12–16.
7. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes // *Diabetes Metab.* — 2012. — Vol. 38. — P. 171–178.
8. Hayashi T., Era S., Kawai K., Imai H., Nakamura K., Onda E., Yoh M. Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract // *Pathophysiology.* — 2000. — Vol. 6. — P. 237–243.
9. Levine R. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease // *Free Radic Biol Med.* — 2002. — Vol. 32. — P. 790–796.
10. Mashiba S., Uchida K., Okuda S., Tomita S. Measurement of glycosylated albumin by the nitroblue tetrazolium colorimetric method // *Clin Chim Acta.* — 1992. — Vol. 212(1–2). — P. 3–15.
11. Oettl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties // *British Journal of Pharmacology.* — 2007. — Vol. 151. — P. 580–590.
12. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts // *Biochimie.* — 2011. — Vol. 93(4). — P. 645–658.
13. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Advanced glycation end products and diabetic complications // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* — 2014. — Vol. 18(1). — P. 1–14.
14. Vlassopoulos A., Lean M.E., Combet E. Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: a neglected interaction // *Free Radic. Biol. Med.* — 2013. — Vol. 60. — P. 318–324.

15. Wa C., Cerny R.L., Clarke W.A., Hage D.S. Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Clin Chim Acta.* — 2007. — Vol. 385(1–2). — P. 48–60.

Поступила 01.02.2015

References

1. Ali Han M.V., Rashid Z., Ali Han V., Ali R. Biohimicheskiy, biofizicheskiy i termodinamicheskiy analiz syvorotochnogo al'bmina cheloveka, glikirovannogo *in vivo* // *Biohimija.* — 2007. — T. 72. — Vyp. 2. — С. 175–183.
2. Dason R., Jelliot D., Jelliot U., Dzhons K. Spravochnik biohimika. — Mir, 1991. — 544 s.
3. Ahmad S., Moinuddin, Ali A. Immunological studies on glycosylated human IgG // *Life Sci.* — 2012. — Vol. 90. — P. 980–987.
4. Aitken A., Learmonth M. Quantification and location of disulfide bonds in proteins // *Methods Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 64. — P. 317–328.
5. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S., Hoy K.S., Wa C., Bolt E., Koke M., Hage D. S. Review: Glycation of human serum albumin // *Clin. Chim. Acta.* — 2013. — Vol. 425. — P. 64–76.
6. Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1247. — P. 12–16.
7. Guerin-Dubourg A., Catan A., Bourdon E., Rondeau P. Structural modifications of human albumin in diabetes // *Diabetes Metab.* — 2012. — Vol. 38. — P. 171–178.
8. Hayashi T., Era S., Kawai K., Imai H., Nakamura K., Onda E., Yoh M. Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract // *Pathophysiology.* — 2000. — Vol. 6. — P. 237–243.
9. Levine R. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease // *Free Radic Biol Med.* — 2002. — Vol. 32. — P. 790–796.
10. Mashiba S., Uchida K., Okuda S., Tomita S. Measurement of glycosylated albumin by the nitroblue tetrazolium colorimetric method // *Clin Chim Acta.* — 1992. — Vol. 212(1–2). — P. 3–15.
11. Oettl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties // *British Journal of Pharmacology.* — 2007. — Vol. 151. — P. 580–590.
12. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts // *Biochimie.* — 2011. — Vol. 93(4). — P. 645–658.
13. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Advanced glycation end products and diabetic complications // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* — 2014. — Vol. 18(1). — P. 1–14.
14. Vlassopoulos A., Lean M.E., Combet E. Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: a neglected interaction // *Free Radic. Biol. Med.* — 2013. — Vol. 60. — P. 318–324.
15. Wa C., Cerny R.L., Clarke W.A., Hage D.S. Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Clin Chim Acta.* — 2007. — Vol. 385(1–2). — P. 48–60.

Received 01.02.2015

Glycation of albumin *in vitro* at normal and elevated blood glucose

Lotosh N.Yu.¹, Savelyev S.V.^{1,3}, Selishcheva A.A.^{1,2}

¹ — ANO «Institute of Biomedical Problems», Moscow, Novodanilovskaya nab., 4a, e-mail: natalotosh@gmail.com

² — Lomonosov Moscow State University, 119991, Russia, Moscow, Lenin Hills, 1, page 12, MSU, e-mail: aselo@yandex.ru

³ — Institute of Human Morphology, 117418, Moscow, st. Cjurupy, 3, e-mail: embrains@hotmail.com

Albumin — the main plasma protein. In blood it exposed to the reactions of glycation and oxidation. Susceptible to oxidation as the different amino acid residues in the molecule of albumin and the free SH-group of Cys at position 34. In diabetes, glycation and oxidation of albumin occurs to a greater degree than normal. The present study investigates the effect of oxidation of SH-groups in the molecule of human serum albumin in its glycation at normal and high values of glucose (5 mM and 50 mM). We found that Trp 214 fluorescence quenching takes place only when the ketoamine level in molecule of albumin level is characterized for chronic hyperglycemia (above 0.4 M/M). Also found that albumin is glycosylated largely if thiol pool albumin is reduced, i.e. SH-groups are partially oxidized.

Key words: high performance liquid chromatography, ketoamine, mercaptalbumin, non-mercaptalbumin, insulin-dependent diabetes, human serum albumin