

УДК 54.04: 665.939.1:543.42

**А. В. Егорова¹, Г. В. Мальцев², Ю. В. Скрипинец¹, С. Н. Кашуцкий²,
В. П. Антонович¹**¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина²ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАБОМОТИЗОЛА
ДИГИДРОХЛОРИДА С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ
ЧЕЛОВЕКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

Исследовано взаимодействие между фабомотизолом дигидрохлоридом (ФД) и сывороточным альбумином человека (САЧ) методом флуоресценции в сочетании с методом ультрафиолетовой спектроскопии в модельных физиологических условиях. Результаты эксперимента показывают, что ФД тушит собственную флуоресценцию белка в результате статического взаимодействия в системе САЧ-ФД, что подтверждается сдвигами в разностных УФ-спектрах САЧ-ФД и уменьшением константы связывания для системы САЧ-ФД с повышением температуры.

Установлены константа и число мест связывания системы САЧ-ФД. Согласно теории резонансного переноса энергии установлено, что среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами для системы САЧ-ФД составляет 1,24 нм.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, флуоресценция, фабомотизола дигидрохлорид.

С биофармацевтической точки зрения одной из наиболее важных проблем является изучение связывания лекарств с белками [1].

При изучении взаимодействия между белком и лекарственным веществом *in vitro* в качестве модели используют сывороточный альбумин человека (САЧ). Он представляет собой единичную полипептидную цепь, состоящую из 585 аминокислотных остатков [2]. САЧ является основным транспортным белком кровяного русла, способным обратимо связывать как эндогенные, так и экзогенные лиганды, такие как жирные кислоты, гормоны и лекарственные вещества. Благодаря присутствию в его составе остатков триптофана, которые характеризуются высокой чувствительностью к окружению, САЧ может быть использован для изучения изменений в спектрах собственной флуоресценции, происходящих вследствие изменений конформационных состояний белка при связывании с субстратами [3].

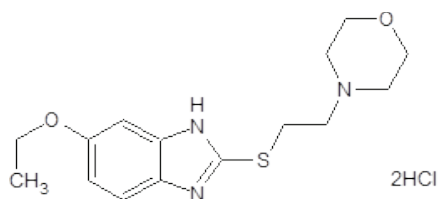
Флуоресцентная спектроскопия является одним из эффективных методов изучения межмолекулярных взаимодействий, отражающих изменение окружения флуорофора. Она помогает установить связывание малых молекул (лекарственных веществ) с белками [4].

В литературе имеется ряд сообщений, посвященных подробному изучению связывания биоактивных веществ с протеинами. Они свидетельствуют о том, что лиганды отличаются природой связывания с САЧ [5 – 14].

Целью данной статьи было спектроскопическое исследование взаимодействия субстанции фабомотизола дигидрохлорида (ФД) и сывороточного альбумина че-

ловека (САЧ), а также определение параметров связывания: оценка константы связывания, установления количества мест связывания и расстояния между донором (САЧ) и акцептором (ФД).

Фабомотизола дигидрохлорид – 5-этокси-2-[(2-морфолин-4-ил-этил)тио]-1*H*-бензимидазола дигидрохлорид, селективный анксиолитик, не относящийся к классу агонистов бензодиазепиновых рецепторов:



Фабомотизола дигидрохлорид (ФД)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали реактивы квалификации х.ч. и бидистиллированную воду.

В качестве рабочего стандартного образца (PCO) использовали фармацевтическую субстанцию фабомотизола дигидрохлорида. Стандартный раствор ФД (10^{-3} моль/л) готовили растворением его точной навески в воде с перемешиванием на магнитной мешалке. Разбавлением водой готовили рабочие растворы ФД (10^{-4} моль/л, 10^{-5} моль/л).

Стандартный раствор САЧ (CAS 70024-90-7, Sigma-Aldrich) (10^{-4} моль/л) готовили растворением навески 665 мг в 100,0 мл воды с перемешиванием на магнитной мешалке. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента экстинкции $36\ 600\ \text{моль}^{-1}\cdot\text{л}\cdot\text{см}^{-1}$ при 280 нм [15]. Разбавлением водой готовили рабочий раствор САЧ (10^{-5} моль/л).

Трис-НСl буферный раствор готовили растворением 6,057 г трис(гидроксиметил)аминометана в 800 мл воды, доводили рН до 7,5 с помощью хлористоводородной кислоты, затем доводили объём раствора до 1000,0 мл водой и перемешивали.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC «Shimadzu» (Япония), а спектры люминесценции на спектрофлуориметре Cary Eclipse «Varian» (Австралия) с ксеноновой лампой 150 Вт. Все спектральные измерения проводили в стандартных 1 см кварцевых кюветках.

В работе использовали весы лабораторные электронные AUX220 (SHIMADZU, Япония) и магнитную мешалку ARE (VELP Scientifica, Италия).

Все измерения проводили при комнатной температуре (23–25°C). Термостатирование проб (для измерений при 25°C и 40°C) проводили на водяной бане LAUDA Aqualine AL2 (фирмы LAUDA DR. R. Wobser GMBH & Co. KG, Германия).

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемый раствор. 1,0 мл трис-НСI буферного раствора, 1,0 мл раствора САЧ и соответствующее количество раствора ФД помещают в мерную колбу вместимостью 10,0 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Растворы выдерживают в течение 5 мин перед измерением.

Раствор сравнения. 1,0 мл трис-НСI буферного раствора, 1,0 мл раствора САЧ помещают в мерную колбу вместимостью 10,0 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. Растворы выдерживают в течение 5 мин перед измерением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронные спектры поглощения

Абсорбционная спектроскопия является простым и подходящим методом, используемым для исследования структурных изменений и изучения различных видов взаимодействия [16]. В спектре ФД наблюдаются три пика с максимумами при 216 нм, 247 нм и 297 нм (рис. 1а). Для первоначальной проверки механизма тушения измеряли и регистрировали спектры УФ-поглощения (САЧ) и ((САЧ + ФД) – ФД). Как показано на рис. 1б, САЧ обладает двумя пиками поглощения при длинах волн 220 нм и 280 нм. Интенсивный пик около 220 нм соответствует поглощению основной цепи САЧ, в то время как слабый пик около 280 нм обусловлен поглощением ароматических аминокислот триптофана (Трип), тирозина (Тир) и фенилаланина (Фен). При добавлении ФД интенсивность пика при 220 нм уменьшается с батохромным смещением примерно на 2 нм, что указывает на изменение в микроокружении вокруг амидных связей в белке, что подтверждает наличие взаимодействия между ФД и САЧ в основном состоянии.

Спектры тушения флуоресценции

Любой процесс, который уменьшает интенсивность флуоресценции образца, называется тушением флуоресценции. Основные причины, которые могут привести к тушению: реакции в возбужденном состоянии, молекулярные перегруппировки, передача энергии, образование аддуктов и тушение в результате столкновений [17].

Взаимодействие ФД с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции белка при добавлении ФД (рисунок 2). Эмиссия САЧ характеризуется широкой полосой при 348 нм. При увеличении концентрации ФД интенсивность флуоресценции САЧ заметно уменьшается. Анализ изменения эмиссии САЧ при различных концентрациях ФД проводили по уравнению Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (1)$$

где: F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя;
 F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя;
 Q – концентрация тушителя;

k_d – константа скорости тушения для бимолекулярной реакции;
 K_{SV} – константа тушения Штерна-Фольмера;
 τ_0 – среднее время жизни возбужденного состояния флуорофора в отсутствие тушителя – 10^{-8} с [12].

На рис. 3 представлены графики зависимости F_0/F от концентрации ФД при разных температурах. Отсутствие прямолинейной зависимости в координатах Штерна-Фольмера показывает, что данное тушение флуоресценции САЧ не вызвано динамическим столкновением, а происходит вследствие образования соединения с ФД, что можно отнести к статическому тушению (подтверждается результатами исследования спектров поглощения) [17].

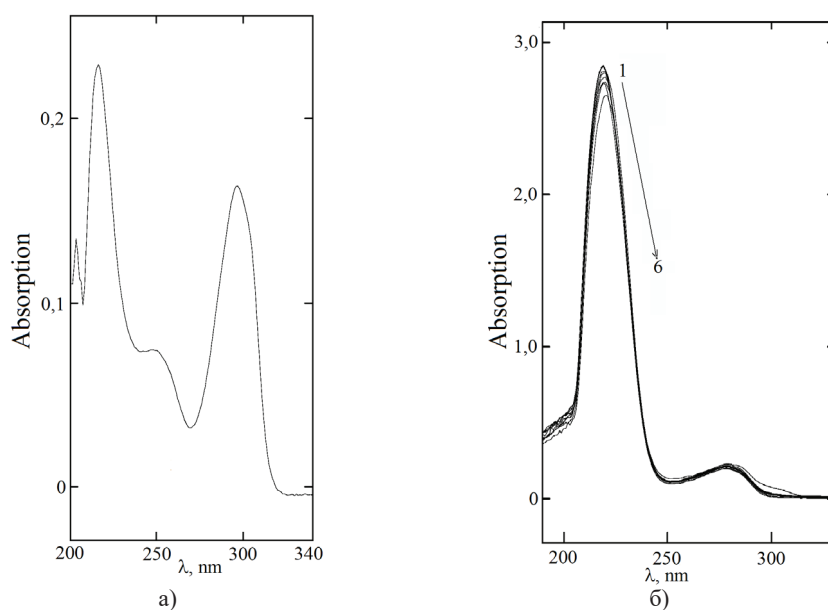


Рис. 1. Спектр поглощения ФД ($C_{\text{ФД}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); влияние ФД на УФ-спектры поглощения САЧ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH } 7,5$, $C_{\text{САЧ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ФД}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 20,0 (2-6 – разностный спектр поглощения между ФД–САЧ и ФД).

Fig. 1. Absorption spectrum of FD ($c_{\text{FD}} = 1.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (a); effect of FD on UV absorption spectra of HSA (b) ($T = 298$ K, $\text{pH } 7.5$, $c_{\text{HSA}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{FD}} \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1-6: 0; 1.0; 2.0; 5.0; 7.0; 10.0; 20.0 (2-6 – difference absorption spectrum between FD–HSA and FD)

Когда малые молекулы независимо связываются с рядом эквивалентных мест макромолекулы, константа (K_A) и количество мест связывания (n) могут быть определены из уравнения (2):

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \cdot \lg [Q] \quad (2)$$

где: F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя; F – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя.

Значения констант (K_A) и количества мест связывания (n), рассчитанные из уравнения (2), для разных температур представлены в таблице. Как видно из приведенных данных, с повышением температуры K_A и n уменьшаются. Очевидно, что более высокая температура приводит к снижению устойчивости аддукта и прочности связывания.

Таблица

Константа связывания (K_A), число мест связывания (n) и расстояние между акцептором и донором (r) при разных температурах и термодинамические параметры взаимодействия ФД-САЧ

Table

Binding constant (K_A), the number of binding sites (n) and distance between acceptor and donor (r) at different temperatures and thermodynamic parameters of FD-HSA interaction

Т(К)	lg K_A	n	r, нм	ΔH° (кДж·моль ⁻¹)	ΔG° (кДж·моль ⁻¹)	ΔS° (Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹)
298	6,15	1,49	1,24	-79,53	-35,07	-149,21
313	5,48	1,32	1,29		-32,83	

Кроме того, значение n значимо больше единицы, поэтому мы можем предположить, что существует более чем одно место связывания САЧ с ФД в макромолекуле.

Значения изменения энтальпии (ΔH°) и изменения энтропии (ΔS°) были получены из уравнения Вант-Гоффа (3), считая ΔH° не меняющимся значительно в экспериментальном диапазоне температур:

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (3)$$

где K_A – константа связывания при определенной температуре T , а R – газовая постоянная.

Величину изменения свободной энергии ΔG° , необходимой для связывания, оценивается по уравнению Гиббса:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

Значения ΔH° и ΔS° для аддукта САЧ–ФД представлены в таблице.

Существует несколько межмолекулярных сил, вызывающих связывание малых молекул лекарственного средства с белками, таких как ван-дер-ваальсовы, водородные, ионные, электростатические и гидрофобные взаимодействия и т. д. Вид взаимодействия определяют на основании данных об изменении энтальпии (ΔH°) и энтропии (ΔS°). Если $\Delta H^\circ > 0$ и $\Delta S^\circ > 0$, то происходит гидрофобное взаимодействие, а если $\Delta H^\circ < 0$ и $\Delta S^\circ < 0$, то преобладают водородные связи и взаимодействие Ван-дер-Ваальса, а если $\Delta H^\circ < 0$ и $\Delta S^\circ > 0$, то это обусловлено электростатикой [18].

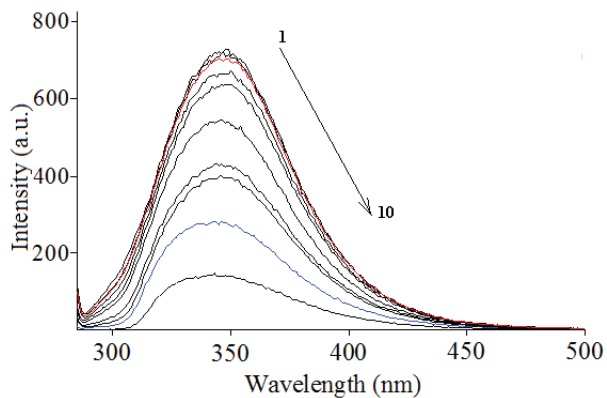


Рис. 2. Спектры флуоресценции САЧ в присутствии различных количеств ФД ($C_{\text{ФД}} \cdot 10^{-5}$ моль/л), кривые (1-10): 0, 0,5, 0, 7, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20 pH 7,5, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм, $C_{\text{САЧ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К)

Fig. 2. Fluorescence emission spectra of HSA in the presence of FD various amounts ($c_{\text{FD}} \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), curves (1-10): 0, 0,5, 0, 7, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20; pH 7.5, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $c_{\text{HSA}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $T = 298$ K)

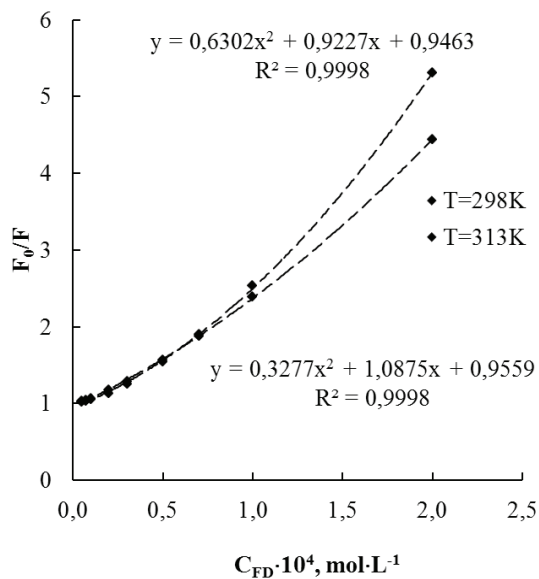


Рис. 3. Зависимости тушения флуоресценции САЧ от концентрации ФД при разных температурах в координатах Штерна-Фольмера (pH 7,5, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 348$ нм, $C_{\text{САЧ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

Fig. 3. Stern-Volmer plots for quenching of HSA fluorescence by FD at different temperatures (pH 7.5, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 348$ nm, $c_{\text{HSA}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Согласно литературным данным отрицательные значения ΔH° и ΔS° можно отнести к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и к образованию водородных связей [19].

Синхронная флуоресцентная спектроскопия

Спектр собственной флуоресценции САЧ чувствителен к микроокружению. Значение длины волны излучения важно в оценке гидрофобности окружения остатков триптофана. Изменение положения максимума флуоресценции соответствует изменению полярности вокруг молекулы флуорофора. Синее смещение (гипсохромное) означает, что аминокислотные остатки расположены в более гидрофобной среде, тогда как красное смещение (батохромное) означает, что аминокислотные остатки находятся в полярной среде.

Информацию о молекулярном окружении молекулы флуорофора могут представлять синхронные спектры флуоресценции. Сущность метода заключается в синхронном сканировании положения монохроматоров возбуждения и флуоресценции при фиксированной разности длин волн, а именно в измерении спектра флуоресценции при одновременном изменении длин волн возбуждающего и регистрируемого излучений. В процессе такого сканирования поддерживается постоянная разность между длинами волн эмиссии и возбуждения ($\Delta\lambda = \lambda_{эм} - \lambda_{возб}$).

Конформационные изменения САЧ, вызванные связыванием с ФД, оценивали путем измерения синхронных спектров флуоресценции САЧ до и при прибавлении различных его количеств (рисунке 4). В соответствии с литературными данными [20], спектры синхронной флуоресценции были получены при $\Delta\lambda = 15$ нм и $\Delta\lambda = 60$ нм для подтверждения взаимодействия с остатками тирозина и триптофана, соответственно.

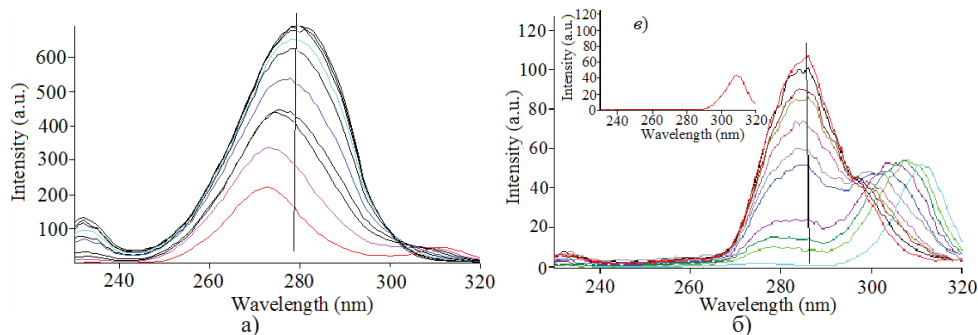


Рис. 4. Синхронные спектры флуоресценции САЧ при добавлении различных количеств ФД ($\Delta\lambda = 60$ нм (а) и $\Delta\lambda = 15$ нм (б); $C_{САЧ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; ($C_{ФД} \cdot 10^{-5}$ моль/л), кривые (1-10): 0, 0,5, 0, 7, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, pH 7,5); синхронный спектр флуоресценции ФД при $\Delta\lambda = 15$ нм (в) ($C_{ФД} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

Fig. 4. Synchronous fluorescence spectra of HSA with the addition of various amounts of FD ($\Delta\lambda = 60$ nm (a) and $\Delta\lambda = 15$ nm (b); $c_{HSA} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; ($c_{FD} \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), curves (1-10): 0, 0,5, 0, 7, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, pH 7,5); synchronous fluorescence spectrum of FD at $\Delta\lambda = 15$ nm (c) ($c_{FD} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Синхронные спектры флуоресценции при $\Delta\lambda = 60$ нм и $\Delta\lambda = 15$ нм показывают гипсохромный сдвиг (от 281 нм до 273 нм и от 286 нм до 274 нм, соответственно), что свидетельствует о наличии изменений конформации белка около остатков триптофана и тирозина.

На рис. 5 показано, что наклон зависимости F/F_0 от концентрации ФД больше при $\Delta\lambda = 15$ нм, что указывает на значительный вклад остатков тирозина в тушение флуоресценции САЧ и на то, что ФД более близко расположен к остаткам тирозина по сравнению с остатками триптофана. Также синхронный спектр флуоресценции ФД при $\Delta\lambda = 15$ нм в присутствии САЧ претерпевает существенный bathochromный сдвиг (рис. 4 б, в), что также свидетельствует о более сильном взаимодействии ФД с остатками тирозина.

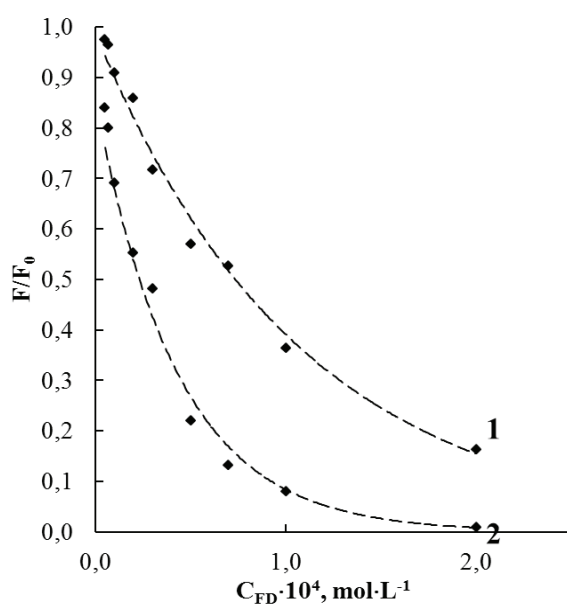


Рис. 5. Зависимости тушения синхронной флуоресценции САЧ от концентрации ФД ($C_{САЧ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $\Delta\lambda = 60$ нм (1) и $\Delta\lambda = 15$ нм (2)).

Fig. 5. Dependencies of quenching synchronous fluorescence of HSA on the concentration of FD ($c_{HSA} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\Delta\lambda = 60$ nm (1) and $\Delta\lambda = 15$ nm (2))

Передача энергии

Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) – это зависящее от расстояния взаимодействие между различными электронными возбужденными состояниями молекул. В этом взаимодействии энергия возбуждения переносится от одной молекулы (донора) к другой (акцептору) посредством прямого электродинамического взаимодействия без испускания фотона из исходной молекулярной системы [21]. Передача энергии может происходить при следующих условиях: когда донор обладает собственной флуоресценцией; когда существует перекрытие спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора; и когда

расстояние между донором и акцептором менее 8 нм. Эффективность передачи энергии между ФД и остатком Трп214 САЧ может быть использована для оценки расстояния между ними с использованием FRET. Перекрытие спектра поглощения ФД и спектра флуоресценции САЧ приведено на рис. 6.

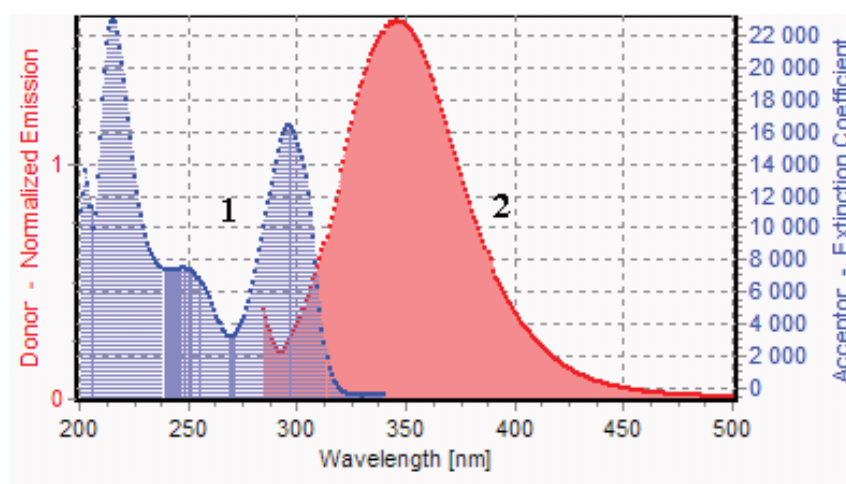


Рис. 6. Перекрытие спектра поглощения ФД (1) и спектра флуоресценции САЧ (2) ($C_{\text{САЧ}} = C_{\text{ФД}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм)

Fig. 6. Overlap of the absorption spectrum of FD (1) with the fluorescence emission spectrum of HSA (2) ($c_{\text{HSA}} = c_{\text{FD}} = 1 \cdot 10^{-6}$ mol·L⁻¹; $T = 298$ K; $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm)

Согласно теории безизлучательного резонансного переноса энергии Ферстера [22], эффективность передачи энергии E зависит от ряда факторов, в том числе от расстояния (r) между связанной биоактивной молекулой (акцептором) и белковым остатком (донором) и часто характеризуется параметром, получившим название «критическое расстояние переноса энергии» (R_0). По теории Ферстера эффективность переноса энергии (E) может быть рассчитана по следующему уравнению:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (5)$$

где: r – расстояние между акцептором (ФД) и донором (САЧ);

R_0 – критическое расстояние, при котором эффективность переноса составляет 50%.

Величина R_0 рассчитывается по следующему уравнению:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J \quad (6)$$

где: K^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов донора и акцептора (может варьироваться от 0 до 4; для случайно ориентированных молекул донора и акцептора используют $K^2 = 2/3$);

n – показатель преломления;

φ – квантовый выход флуоресценции донора;

J – интеграл перекрытия спектра излучения донора и спектра поглощения акцептора (рис. 6), который определяется по формуле:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda)\varepsilon(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda)d\lambda} \quad (7)$$

где: $F(\lambda)$ – нормированная интенсивность флуоресценции донора при длине волны λ ;

$\varepsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения акцептора при длине волны λ .

В данном случае при $K^2 = 2/3$, $n = 1,336$ и $\varphi = 0,118$ [23] из уравнений (5)–(7) вычислены параметры: $J = 7,0 \cdot 10^{-16}$ см³ л моль⁻¹; $R_0 = 1,58$ нм; $r = 1,24$ нм.

Расстояние (r) между САЧ Trp214 и ФД намного меньше 8 нм, что удовлетворяет соотношению $0,5R_0 < r < 1,5R_0$. Это означает, что с большой вероятностью происходит безызлучательная передача энергии от САЧ к ФД, что соответствует механизму статического тушения.

ВЫВОДЫ

Проведено спектроскопическое изучение взаимодействия фабомотизола дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека. Установлены константа и число мест связывания, среднее расстояние (1,24 нм) между донорными и акцепторными молекулами для системы САЧ-ФД. Показано, что ФД тушит собственную флуоресценцию белка в результате статического взаимодействия в системе САЧ-ФД. Определены термодинамические параметры и установлено, что важную роль в связывании ФД с САЧ играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и образование водородных связей.

Такое стандартизированное изучение взаимодействия между САЧ и ФД является полезным для фармацевтической промышленности и клинической медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gentili P.L., Ortica F., Favaro G.* Static and Dynamic Interaction of a Naturally Occurring Photochromic Molecule with Bovine Serum Albumin Studied by UV-Visible Absorption and Fluorescence Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – Vol. 112. – P. 16793-16801. <http://dx.doi.org/10.1021/jp805922g>
2. *Tian J.N., Liu J.Q., He W., Hu Z.O., Yao X.J., Chen X.G.* Probing the Binding of Scutellarin to Human Serum Albumin by Circular Dichroism, Fluorescence Spectroscopy, FTIR and Molecular Modeling Method // *Biomacromolecules* – 2004. – Vol. 5. – P. 1956-1961. <http://dx.doi.org/10.1021/bm049668m>
3. *Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 353, N 1. – P. 38 – 52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>
4. *Roy S.* Review on interaction of serum albumin with drug molecules research and reviews // *J. Pharmacol. Toxicol. Stud.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P. 7 – 16.
5. *Wang Y., Huang F., Liu Y.* Study on the interaction of cefazolin and ceftriaxone with human serum albumin with multi-spectroscopic and docking methods // *Spectrosc. Spectral Anal.* – 2017. – Vol. 37, N 4. – P. 1205 – 1210. [http://dx.doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2017\)04-1205-06](http://dx.doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2017)04-1205-06)
6. *Roy S., Ganai S., Nandi R. K., Majumdar K.C., Das T. K.* Studies of the interaction of bovine serum albumin with pyrimidine-annulated spirodihydrofuran and its biological activities // *Adv. Mater. Lett.* – 2015. – Vol. 6, N 11. – P. 1018-1024. <http://dx.doi.org/10.5185/amlett.2015.5933>

7. Xu H., Yao N., Xu H., Wang T., Li G., Li Z. Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 14185-14203. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140714185>
8. Dong S., Li Z., Shi L., Huang G., Chen S., Huang T. The interaction of plant-growth regulators with serum albumin: Molecular modeling and spectroscopic methods // *Food Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol. 67. – P. 123–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.020>
9. Gowda B., Mallappa M., Gowda J., Rengasamy R. Interaction of ketoconazole with bovine serum albumin: electrochemical, spectroscopic and molecular modeling studies // *J. Appl. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 5. – P. 037-044. <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2015.58.S6>
10. Abu Teir M.M., Ghithan J., Abu-Taha M.I., Darwish S.M., Abu-hadid M.M. Spectroscopic approach of the interaction study of ceftriaxone and human serum albumin // *J. Biophys. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 6. – P. 1-12. <http://dx.doi.org/10.5897/JBSB2013.0045>
11. Hamdi O., Feroz S., Shilpi J., Anouar El. H., Mukarram A., Mohamad S.B., Tayyab S., Awang K. Spectrofluorometric and molecular docking studies on the binding of curcumenol and curcumenone to human serum albumin // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 5180-5193. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16035180>
12. Salam M.A., Rokonujjaman M., Rahman A., Sultana U.N., Zakir S.M. Study of in Vitro Interaction of Sildenafil Citrate with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy // *Pharmacol. Pharm.* – 2015. – Vol. 6. – P. 94-101. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.62012>
13. Meti M.D., Nandibewoor S.T., Joshi S.D., More U.A., Chimatadar S.A. Multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomycin with bovine serum albumin // *J. Pharm. Anal.* – 2015. – Vol. 5. – P. 249–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.004>
14. Naik P.N., Nandibewoor S.T., Chimatadar S.A. Non-covalent binding analysis of sulfamethoxazole to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, UV-vis, FT-IR, voltammetric and molecular modeling // *J. Pharm. Anal.* – 2015. – Vol. 5. – P. 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.003>
15. Khan S.N., Islam B., Khan A.U. Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effect on structural state of protein // *Int. J. Integ. Biol.* – 2007. – Vol. 1. – P. 102–112.
16. Valeur B., Brochon J.C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. Berlin. Springer. 1999. – P. 25–28.
17. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York. Springer. 2006. – 954 p.
18. Ross P.D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability // *Biochemistry* – 1981. – Vol. 20. – P. 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>
19. Aki H., Yamamoto M. Thermodynamics of the binding of phenothiazines to human plasma, human serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein: a calorimetric study // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 41. – P. 674-679. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06339.x>
20. Miller J.N. Recent advances in molecular luminescence analysis // *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* – 1979. – Vol. 16, No 7. – P. 203–208.
21. Wu P., Brand L. Resonance energy transfer: Methods and applications // *Anal. Biochem.* – 1994. – Vol. 218. – P. 1–13.
22. Forster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz // *Ann. Phys.* – 1948. – Vol. 2. – P. 55–75.
23. Xiao J.B., Shi J., Cao H., Wu S.D., Ren F.L., Xu M. Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 45. – P. 609–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.032>

Стаття надійшла до редакції 01.03.2019

А. В. Єгорова¹, Г. В. Мальцев², Ю. В. Скрипинець¹, С. М. Кашуцький²,
В. П. Антонович¹

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

²ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФАБОМОТИЗОЛУ ДИГІДРОХЛОРИДУ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ ЛЮДИНИ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ

Вивчення зв'язування лікарських засобів з білками стало важливим напрямком досліджень у галузі наук про життя, хімії та клінічної медицини. У фізіологічних умовах досліджували взаємодію *in vitro* між селективним анксиолітиком, який належить до класу агоністів бензодіазепінових рецепторів-5-етокси-2-[(2-морфолін-4-іл-етил)тіо]-1Н-бензimidазол дигідрохлоридом (фабомотизолом дигідрохлоридом, ФД) та сироватковим альбуміном людини (САЛ) за довжини хвилі збудження 280 нм та при різних температурах (298К і 313К) методом флуоресцентної емісійної спектроскопії. Випромінювання САЛ характеризується широкою смугою за довжини хвилі 348 нм. Результати експерименту показали, що ФД гасить власну флуоресценцію білка в результаті статичної взаємодії в системі САЛ – ФД, що підтверджується зсувами в різних УФ – спектрах та зменшенням константи зв'язування у системі САЛ – ФД з підвищенням температури. Встановлено константу ($\lg K_A = 6,15$ при 298 К) і кількість місць зв'язування у системі САЛ – ФД. Негативні значення зміни ентальпії (ΔH°) та зміни ентропії (ΔS°) можна віднести частково до ван-дер-ваальсових сил та частково до утворення водневих зв'язків. Відповідно до теорії резонансного переносу енергії, встановлено, що середня відстань між донорними і акцепторними молекулами для системи САЛ – ФД становить 1,24 нм. Показано перекриття спектру абсорбції ФД зі спектром флуоресценції САЛ. Отримані дані показують, що ФД може бути використаний як флуоресцентний зонд для протеїнів, які є особливо придатними для виявлення змін локальної полярності. Оскільки фармацевтичні фірми потребують стандартизованих скринінгів для зв'язування з білками на першому етапі створення нового лікарського засобу, таке дослідження взаємодії між САЛ і ФД було б корисним у фармацевтичній промисловості та клінічній медицині.

Ключові слова: сироватковий альбумін людини, флуоресценція, фабомотизолу дигідрохлорид.

А. V. Yegorova¹, G. V. Maltsev², Yu. V. Scrypynets¹, S. N. Kashutskyy²,
V. P. Antonovich¹

¹A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

²"INTERCHEM", Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

STUDY OF INTERACTION OF FABOMOTIZOLE DIHYDROCHLORIDE WITH HUMAN SERUM ALBUMIN BY FLUORESCENT METHOD

Drug-protein binding has become an important research field in life sciences, chemistry and clinical medicine. Under physiological conditions, *in vitro* interaction between the selective anxiolytic (non-benzodiazepine receptor agonist) drug 5-ethoxy-2-[(2-morpholin-4-yl-ethyl)thio]-1H-benzimidazole dihydrochloride (fabomotizole dihydrochloride, FD) and human

serum albumin (HSA) was investigated at excitation wavelength 280 nm and at different temperatures (298 K and 313 K) by fluorescence emission spectroscopy.

The emission of HSA is characterized by a broad emission band at 348 nm. The results of the experiment showed that FD quench the intrinsic fluorescence of the protein as a result of static interaction in the HSA – FD system, which is confirmed by shifts in the difference UV spectra of the HSA – FD and the reduction of the binding constant for the HSA – FD system with increasing temperature.

The constant ($\lg K_d = 6.15$ at 298 K) and the number of binding sites of the HSA – FD system are established. The negative values of enthalpy change (ΔH°) and entropy change (ΔS°) can be attributed in part to van der Waals forces and in part to the formation of hydrogen bonds. A value of 1.24 nm for the average distance r between FD (acceptor) and tryptophan residues of HSA (donor) was estimated on the basis of the Förster resonance energy transfer (FRET). The overlap of the absorbance spectrum of FD with the fluorescence emission spectrum of HSA has been shown.

The obtained data show that FD can be used as fluorescence probe for proteins being especially suitable for detecting the changes in the local polarity. Since, the pharmaceutical firms need standardized screens for protein binding in the first step of new drug design, this kind of study of interaction between HSA with FD would be useful in pharmaceutical industry and clinical medicine.

Key words: human serum albumin, fluorescence, fabomotizole dihydrochloride.

REFERENCES

1. Gentili P.L., Ortica F., Favaro G. *Static and Dynamic Interaction of a Naturally Occurring Photochromic Molecule with Bovine Serum Albumin Studied by UV-Visible Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B., 2008, vol. 112, pp. 16793-16801. <http://dx.doi.org/10.1021/jp805922g>
2. Tian J.N., Liu J.Q., He W., Hu Z.O., Yao X.J., Chen X.G. *Probing the Binding of Scutellarin to Human Serum Albumin by Circular Dichroism, Fluorescence Spectroscopy, FTIR and Molecular Modeling Method*. Biomacromolecules, 2004, vol. 5, pp. 1956-1961. <http://dx.doi.org/10.1021/bm049668m>
3. Ghuman J., Zunsain P. A., Petitpas I. *Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin*. J. Mol. Biol., 2005, vol. 353, no 1. pp. 38 – 52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075>
4. Roy S. *Review on interaction of serum albumin with drug molecules research and reviews*. J. Pharmacol. Toxicol. Stud. 2016, vol. 4, no 2, pp. 7 – 16.
5. Wang Y., Huang F., Liu Y. *Study on the interaction of cefazolin and ceftriaxone with human serum albumin with multi-spectroscopic and docking methods*. Spectrosc. Spectral. Anal., 2017, vol. 37, no 4, pp. 1205 – 1210. [http://dx.doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2017\)04-1205-06](http://dx.doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2017)04-1205-06)
6. Roy S., Ganai S., Nandi R. K., Majundar K.C., Das T.K. *Studies of the interaction of bovine serum albumin with pyrimidine-annulated spirodihydrofuran and its biological activities*. Adv. Mater. Lett., 2015, vol. 6, no 11, pp. 1018-1024. <http://dx.doi.org/10.5185/amlett.2015.5933>
7. Xu H., Yao N., Xu H., Wang T., Li G., Li Z. *Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods*. Int. J. Mol. Sci., 2013, vol. 14, pp. 14185-14203. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140714185>
8. Dong S., Li Z., Shi L., Huang G., Chen S., Huang T. *The interaction of plant-growth regulators with serum albumin: Molecular modeling and spectroscopic methods*. Food Chem. Toxicol., 2014, vol. 67, pp. 123–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.020>
9. Gowda B., Mallappa M., Gowda J., Rengasamy R. *Interaction of ketoconazole with bovine serum albumin: electrochemical, spectroscopic and molecular modeling studies*. J. Appl. Pharm. Sci., 2015, vol. 5, pp. 037-044. <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2015.58.S6>
10. Abu Teir M.M., Ghithan J., Abu-Taha M.I., Darwish S.M., Abu-hadid M.M. *Spectroscopic approach of the interaction study of ceftriaxone and human serum albumin*. J. Biophys. Struct. Biol., 2014, vol. 6, pp. 1-12. <http://dx.doi.org/10.5897/JBSB2013.0045>
11. Hamdi O., Feroz S., Shilpi J., Anouar El. H., Mukarram A., Mohamad S.B., Tayyab S., Awang K. *Spectrofluorometric and molecular docking studies on the binding of curcumenol and curcumenone to human serum albumin*. Int. J. Mol. Sci., 2015, vol. 16, pp. 5180-5193. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16035180>
12. Salam M.A., Rokonujjaman M., Rahman A., Sultana U.N., Zakir S.M. *Study of in Vitro Interaction of Sildenafil Citrate with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy*. Pharmacol. Pharm., 2015, vol. 6, pp. 94-101. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.62012>

13. Meti M.D., Nandibewoor S.T., Joshi S.D., More U.A., Chimatadar S.A. *Multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomycin with bovine serum albumin*. J. Pharm. Anal., 2015, vol. 5, pp. 249–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.004>
14. Naik P.N., Nandibewoor S.T., Chimatadar S.A. *Non-covalent binding analysis of sulfamethoxazole to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, UV-vis, FT-IR, voltammetric and molecular modeling*. J. Pharm. Anal., 2015, vol. 5, pp. 143–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.003>
15. Khan S.N., Islam B., Khan A.U. *Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effect on structural state of protein*. Int. J. Integ. Biol., 2007, vol. 1, pp. 102–112.
16. Valeur B., Brochon J.C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. Berlin, Springer, 1999, pp. 25–28.
17. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, Springer, 2006, 954 p.
18. Ross P.D., Subramanian S. *Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability*. Biochem., 1981, vol. 20, pp. 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>
19. Aki H., Yamamoto M. *Thermodynamics of the binding of phenothiazines to human plasma, human serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein: a calorimetric study*. J. Pharm. Pharmacol., 1989, vol. 41, pp. 674–679. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06339.x>
20. Miller J.N. *Recent advances in molecular luminescence analysis*. Proc. Anal. Div. Chem. Soc., 1979, vol. 16, no 7, pp. 203–208.
21. Wu P., Brand L. *Resonance energy transfer: Methods and applications*. Anal. Biochem., 1994, vol. 218, pp. 1–13.
22. Forster T. *Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz*. Ann. Phys., 1948, vol. 2, pp. 55–75.
23. Xiao J.B., Shi J., Cao H., Wu S.D., Ren F.L., Xu M. *Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2007, vol. 45, pp. 609–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.032>