

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

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДОЛУТЕГРАВИРА НАТРИЯ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

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

Установлены константа и число мест связывания системы САЧ-ДН. Согласно теории резонансного переноса энергии установлено, что среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами для системы САЧ-ДН составляет 2,14 нм.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, флуоресценция, долутегравир натрия.

Изучение связывания лекарств с белками является важным для целей биохимии и медицины [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].

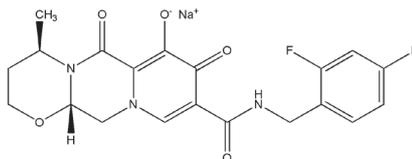
Флуоресцентная спектроскопия является одним из эффективных методов изучения межмолекулярных взаимодействий, отражающих изменение окружения флуорофора. Она помогает установить связывание малых молекул (лекарственных веществ) с белками [4].

В литературе имеется ряд сообщений, посвященных подробному изучению связывания метаболитов, лекарств, красителей, жирных кислот, биоактивных веществ с протеинами. Они свидетельствуют о том, что лиганды отличаются природой связывания с САЧ [5 – 25].

Целью данной статьи было спектроскопическое исследование взаимодействия субстанции долутегравир натрия (ДН) и сывороточного альбумина человека (САЧ),

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

Долутегравир натрия — (4R,12aS)-9-[(2,4-дифторфенил)метил]карбамоил}-4-метил-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12а-гексагидро-2Н-пиридо[1',2':4,5]пиразино[2,1-б][1,3]оксазин-7-олат натрия) противовирусное средство из класса ингибиторов интегразы второго поколения:



Долутегравир натрия (ДН)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

В качестве рабочего стандартного образца (PCO) использовали фармацевтическую субстанцию долутегравира натрия, производства Cipla Ltd., Индия.

Стандартный раствор ДН (10^{-3} моль/л) готовили растворением его точной навески в диметилформамиде с перемешиванием на магнитной мешалке. Разбавлением водой готовили рабочие растворы ДН (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 [26]. Разбавлением водой готовили рабочий раствор САЧ (10^{-5} моль/л).

Трис-НСI 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 40°C) проводили на водяной бане WNB 7-45 (MettmertGmbH, Германия).

Методика определения

Испытуемый раствор. 1,0 мл трис-НСI буферного раствора, 1,0 мл раствора САЧ и соответствующее количество раствора ДН помещают в мерную колбу вместимостью 10,0 мл, доводят объём раствора водой *P* 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 объем раствора водой *P* 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 [27]. В спектре ДН наблюдаются широкий пик с максимумами при 225 нм (рис. 1, а). Для первоначальной проверки механизма тушения измеряли и регистрировали спектры УФ-поглощения (САЧ) и ((САЧ + ДН) – ДН). Как показано на рис. 1, б, 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 (Трп), тирозина (Тир) и фенилаланина (Фен). При добавлении ДН интенсивность пика при 220 нм уменьшается с батохромным смещением примерно на 9 нм, что указывает на изменение в микроокружении вокруг амидных связей в белке, что подтверждает наличие взаимодействия между ДН и САЧ в основном состоянии.

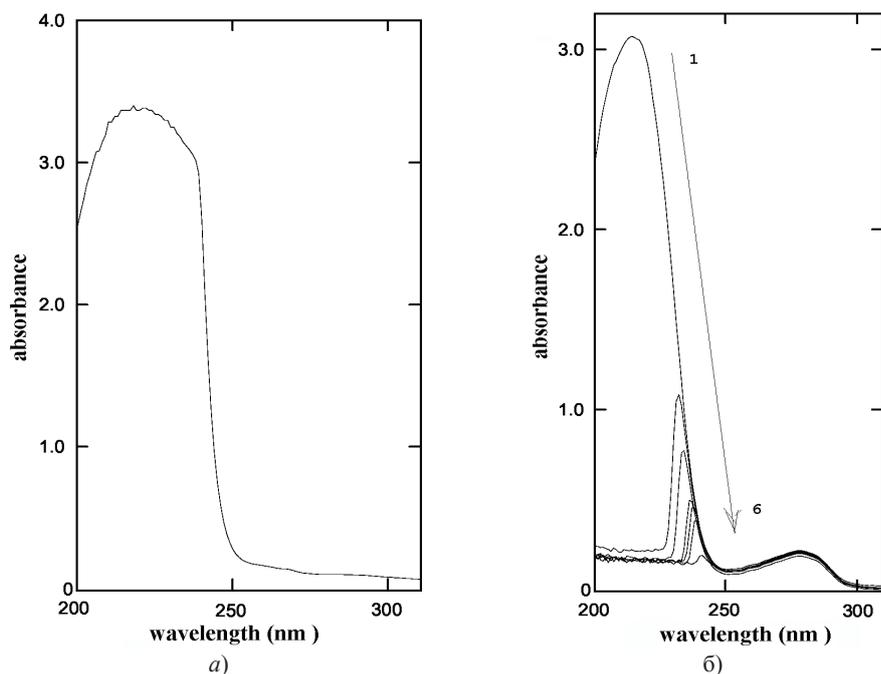


Рис. 1. Спектр поглощения ДН ($C_{\text{ДН}} = 2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); влияние ДН на УФ-спектры поглощения САЧ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЧ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ДН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 20,0 (2-6 – разностный спектр поглощения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

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 [28].

Взаимодействие ДН с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции белка при добавлении ДН (рис. 2). Эмиссия САЧ характеризуется широкой полосой при 346 нм. При увеличении концентрации ДН интенсивность флуоресценции САЧ заметно уменьшается. Анализ изменения эмиссии САЧ при различных концентрациях ДН проводили по уравнению Штерна-Фольмера:

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

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

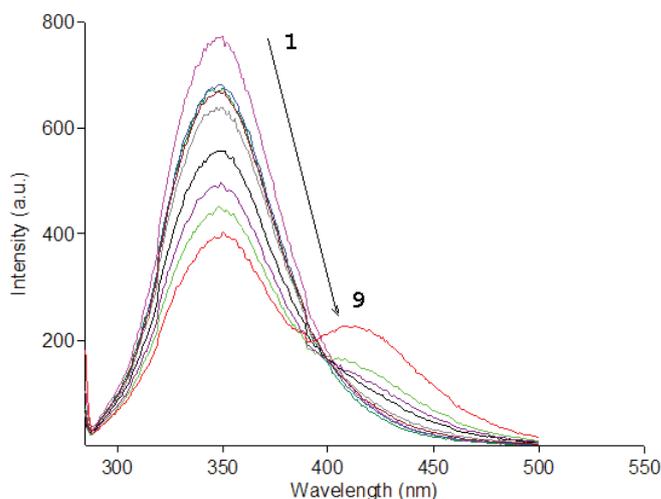


Рис. 2. Спектры флуоресценции САЧ в присутствии различных количеств ДН ($C_{\text{ДН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), кривые (1-9): 0, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 70, рН 7,5, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм, $C_{\text{САЧ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К).

На рис. 3 представлены графики зависимости F_0/F от концентрации ДН при разных температурах. Они демонстрируют удовлетворительные линейные кор-

реляции, из которых установлены константы тушения Штерна-Фольмера K_{SV} (табл. 1).

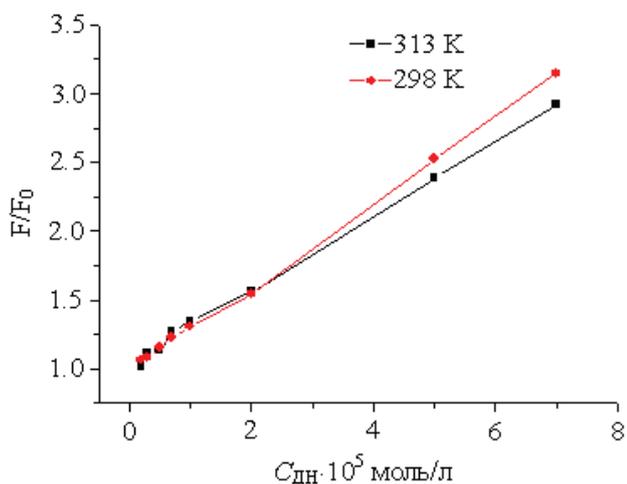


Рис. 3. Зависимости тушения флуоресценции САЧ от концентрации ДН при разных температурах в координатах Штерна-Фольмера (рН 7,5, $\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 346$ нм, $C_{САЧ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

Таблица 1

Константы Штерна-Фольмера и константы тушения САЧ при добавлении ДН при разных температурах

$T(K)$	$K_{SV} \cdot 10^{-4} (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1})$	R^a	SD	$k_q \cdot 10^{-12} (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$
298	1,72	0,9983	0,0352	1,72
313	1,34	0,9963	0,0408	1,34

a – коэффициент корреляции; SD - остаточное стандартное отклонение линейной регрессии

Процесс тушения обычно может быть вызван процессом столкновения и/или образованием аддукта между тушителем и флуорофором. Величины констант скорости тушения в таблице 1 имеют размерность $10^{12} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Очевидно, что константа скорости тушения k_q для ДН-САЧ больше, чем константа диффузии биополимеров $10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, которая лимитирует скорость столкновений [29]. Таким образом, это показывает, что данное тушение флуоресценции САЧ не вызвано динамическим столкновением, а происходит вследствие образования соединения с ДН, что можно отнести к статическому тушению (что подтверждается результатами исследования спектров поглощения). Кроме того, линейность графиков Штерна-Фольмера указывает на существование одного типа тушения [30].

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

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

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 табл. 2.

Таблица 2

Константа связывания K_A , число мест связывания n и расстояние между акцептором и донором r при разных температурах и термодинамические параметры взаимодействия ДН-САЧ при pH 7,5 ($\lambda_{ex} = 280$ нм)

$T(K)$	$K_A \cdot 10^3 (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1})$	n	r	ΔH° (кДж·моль ⁻¹)	ΔG° (кДж·моль ⁻¹)	ΔS° (Джмоль ⁻¹ ·К ⁻¹)
298	9,82	1,11	2,14	-65,96	-5,66	-202,33
313	2,74	0,99	2,12		-2,63	

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.

Кроме того, значение n близко к единице, поэтому мы можем заключить, что существует только одно место связывания в макромолекуле САЧ с ДН (определенное этим методом).

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° and ΔS° для аддукта САЧ –ДН представлены в таблице 2.

Существует несколько межмолекулярных сил, вызывающих связывание малых молекул лекарственного средства с белками, таких как ван-дер-ваальсова, водородная связь, 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 [31].

Согласно литературным данным отрицательные значения ΔH° и ΔS° можно в отнести к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям и к образованию водородных связей [32].

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 предоставлять 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 ДН, оценивали путем измерения синхронных спектров флуоресценции САЧ до и при прибавлении различных его количеств (рис. 4). В соответствии с литературными данными [33], спектры синхронной флуоресценции были получены при $\Delta\lambda = 15$ нм и $\Delta\lambda = 60$ нм для подтверждения взаимодействия с остатками тирозина и триптофана, соответственно.

Синхронные спектры флуоресценции при $\Delta\lambda = 60$ нм показывают батохромный сдвиг (от 281 нм до 287 нм), что свидетельствует о наличии изменений конформации белка около триптофана, а при $\Delta\lambda = 15$ нм показывают отсутствие изменения максимума длины волны, что отражает незначительное изменение окружения тирозина.

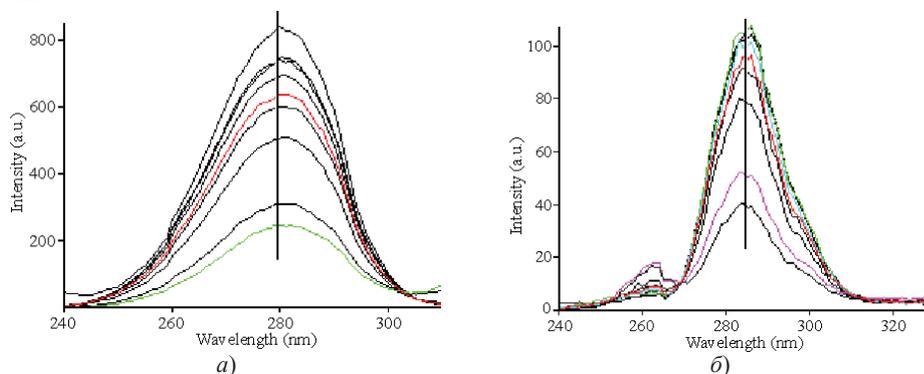


Рис. 4. Синхронные спектры САЧ при добавлении различных количеств ДН ($\lambda = 60$ нм (а) и $\lambda = 15$ нм (б); $C_{САЧ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; ($C_{ДН} \cdot 10^{-6}$ моль/л), кривые (1-9): 0, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 70, рН 7,5)

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 мо-

лекулярной системы [34]. 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 ДН и остатком Трп214 САЧ может быть использована для оценки расстояния между ними с использованием FRET. Перекрытие спектра поглощения ДН и спектра флуоресценции САЧ приведено на рис. 5.

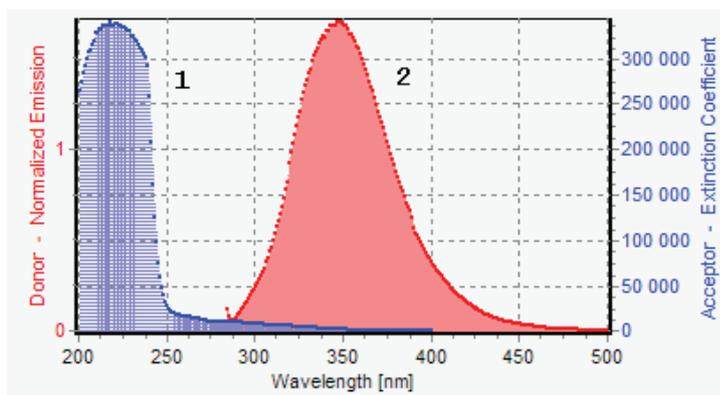


Рис. 5. Перекрытие спектра поглощения ДН (1) и спектра флуоресценции САЧ (2)
 $(C_{\text{САЧ}}/C_{\text{ДН}} = 1:1,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм)

Согласно теории безызлучательного резонансного переноса энергии Ферстера [35], 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 (ДН) и донором (САЧ); R_0 – критическое расстояние, при котором эффективность переноса составляет 50%.

Величина R_0 рассчитывается по следующему уравнению:

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J \quad (6)$$

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. 5), 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 $K^2 = 2/3$, $n = 1,336$ и $\varphi = 0,118$ [36]. Следовательно, из уравнений (5)–(7) вычислены параметры, представленные в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка параметров связывания с белками различных малых молекул

Малые молекулы	Белок	J (см ³ ·л·моль ⁻¹)	R_0 (нм)	r (нм)	Литература
митоксантрон	САЧ	$1.67 \cdot 10^{-15}$	0.48	2.64	[5]
имидаклоприд	САЧ	$3.17 \cdot 10^{-15}$	1.52	2.10	[6]
каптоприл	САЧ	$1.09 \cdot 10^{-18}$	2.37	1.05	[7]
флавоноид (eupatorin)	БСА	$1.79 \cdot 10^{-14}$	1.56	1.64	[9]
эрлотиниба гидрохлорид	БСА	$3.89 \cdot 10^{-21}$	2.00	2.20	[10]
сангвинарин	БСА	$1.29 \cdot 10^{-14}$	2.63	2.38	[11]
карбамазепин	БСА	$3.24 \cdot 10^{-15}$	2.11	3.60	[12]
нарингин	БСА	$3.24 \cdot 10^{-15}$	2.32	3.25	[13]
3-карбоксифеноксатиин	БСА	$1.63 \cdot 10^{-15}$	1.86	1.86	[14]
паклобутразол	САЧ	$1.35 \cdot 10^{-14}$	2.58	4.41	[15]
пазуфлоксацин мезилат	БСА	$9.93 \cdot 10^{-15}$	2.45	4.04	[16]
бензидин	трипсин	$3.92 \cdot 10^{-15}$	2.67	2.97	[17]
неваденсин	лизоцим	$8.17 \cdot 10^{-15}$	2.41	2.28	[18]
фосфомицин	БСА	$1.87 \cdot 10^{-14}$	2.83	4.99	[24]
сульфаметоксазол	САЧ	$1.70 \cdot 10^{-16}$	2.79	3.89	[25]
долутеграбир натрия	САЧ	$3.16 \cdot 10^{-15}$	2.03	2.14	данная работа

Расстояние (r) между САЧ Trp214 и ДН 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 ДН, что соответствует механизму статического тушения.

ВЫВОДЫ

Проведено спектроскопическое изучение взаимодействия долутегравира натрия с сывороточным альбумином человека. Установлены константа и число мест связывания, среднее расстояние (2,14 нм) между донорными и акцепторными молекулами для системы САЧ-ДН. Показано, что ДН тушит собственную флуоресценцию белка в результате статического взаимодействия в системе САЧ-ДН. Определены термодинамические параметры и установлено, что важную роль в связывании ДН с САЧ играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и образование водородных связей.

Такое стандартизированное изучение взаимодействия между САЧ и ДН 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 // *Bio-macromolecules* – 2004. – Vol. 5. – P. 1956-1961. <http://dx.doi.org/10.1021/bm049668m>
3. *Peters T.* All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications; Academic Press: San Diego, CA, USA. – 1996. – 432 p.
4. *Kwon S., Carson J.H.* Fluorescence Quenching and Dequenching Analysis of RNA Interactions in Vitro and in Vivo // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol. 264. – P. 133-140. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1998.2846>
5. *Khan S.N., Islam B., Yennamalli R., Sultan A., Subbarao N., Khan A.U.* Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies // *Europ. J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 35. – P. 371–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2008.07.010>
6. *Wang Y., Tang B., Zhang H., Zhou Q., Zhang G.* Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: Spectroscopic approach // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* – 2009. – Vol. 94. – P. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.013>
7. *Gao X., Tang Y., Rong W., Zhang X., Zhao W., Zi Y.* Analysis of binding interaction between captopril and human serum albumin // *Amer. J. Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 2. – P. 250-257. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2011.22030>
8. *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, No11. – P. 1018-1024. <http://dx.doi.org/10.5185/amlett.2015.5933>
9. *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>
10. *Rasoulzadeh F., Asgari D., Naseri A., Rashidi M.R.* Spectroscopic studies on the interaction between erlotinib hydrochloride and bovine serum albumin // *DARU* – 2010. – Vol. 18. – P. 179-184.
11. *Hossain M., Khan A.Y., Kumar G.S.* Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin. *PLOS One* // 2011. – Vol. 6, No 4. –P. e18333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018333>
12. *Wang C., Wu Q.-H., Wang Z., Zhao J.* Study of the interaction of carbamazepine with bovine serum albumin by fluorescence quenching method // *Anal. Sci.* – 2006. – Vol. 22. – P. 435-438. https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/22/3/22_3_435/_pdf
13. *Roy A.S., Tripathy D.R., Chatterjee A., Dasgupta S.* A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin // *J. Biophys. Chem.* – 2010. – Vol. 1. – P. 141-152. <http://dx.doi.org/10.4236/jbpc.2010.13017>
14. *Varlan A., Hillebrand M.* Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy // *Molecules* – 2010. – Vol. 15. – P. 3905-3919. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15063905>
15. *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>

16. Jin J., Zhang X. Spectrophotometric studies on the interaction between pazufloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme // *J. Lumin.* – 2008. – Vol. 128. – P. 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.05.008>
17. Zhang H.M., Wang Y.Q., Zhou Q.H. Fluorimetric study of interaction of benzidine with trypsin // *J. Lumin.* – 2010. – Vol. 130. – P. 781–786. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2009.11.032>
18. Li D., Zhu J., Jin J. Spectrophotometric studies on the interaction between nevadensin and lysozyme // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* – 2007. – Vol. 189. – P. 114–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.01.017>
19. Zhu J., Li D., Jin J., Wu L. Binding analysis of farrerol to lysozyme by spectroscopic methods // *Spectrochim. Acta Part A* – 2007. – Vol. 68. – P. 354–359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2006.11.045>
20. 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>
21. 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>
22. 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>
23. 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 // *Pharmacology & Pharmacy* – 2015. – Vol. 6. – P. 94–101. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.62012>
24. 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>
25. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.003>
26. 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.
27. Valeur B., Brochon J.C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy* 6th edn (Berlin : Springer); 1999, pp. 25–28.
28. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3rd edn New York:Springer; 2006; 954 p.
29. Sahoo B.K., Ghosh K.S., Dasgupta S. Molecular interactions of isoxazolcurcumin with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies // *Biopolymers* – 2009. – Vol. 91. – P. 108–119. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.21092>
30. Silva D., Cortez C.M., Cunha-Bastos J., Louro S.R.W. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin // *Toxicol. Lett.* – 2004. – Vol. 147. – P. 53–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.014>
31. 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>
32. 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>
33. Miller J.N. Recent advances in molecular luminescence analysis // *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* – 1979. – Vol. 16, No 7. – P. 203–208.
34. Wu P., Brand L. Resonance energy transfer: Methods and applications // *Anal. Biochem.* – 1994. – Vol. 218. – P. 1–13.
35. Forster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz // *Ann. Phys.* – 1948. – Vol. 2. – P. 55–75.
36. 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 21.07.2017

A. B. Egorova¹, G. V. Maltsev², Yu. V. Scrypynets¹, S. N. Kashutskyy²,
V. P. Antonovich¹

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

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

СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДОЛУТЕГРАВІРУ НАТРІЮ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ ЛЮДИНИ

Досліджено взаємодію між долутегравіром натрію (ДН) і сироватковим альбуміном людини (САЛ) методом флуоресценції в поєднанні з методом ультрафіолетової спектроскопії в модельних фізіологічних умовах. Результати експерименту показують, що ДН гасить власну флуоресценцію білка в результаті статичної взаємодії в системі САЛ-ДН, що підтверджується зсувами в різностних УФ-спектрах САЛ-ДН і зменшенням константи зв'язування для системи САЛ-ДН з підвищенням температури. Встановлено константу та число місць зв'язування системи САЛ-ДН. Відповідно до теорії резонансного переносу енергії, встановлено, що середня відстань між донорними і акцепторними молекулами для системи САЛ-ДН становить 2,14 нм.

Ключові слова: сироватковий альбумін людини, флуоресценція, долутегравір натрію.

A. 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

SPECTROSCOPIC STUDY OF INTERACTION OF SODIUM DOLUTEGRAVIR WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

Drug-protein binding has become an important research field in life sciences, chemistry and clinical medicine. Under physiological conditions, *in vitro* interaction between the antiviral drug 2 Sodium (4R, 12aS)-9-[(2,4-difluorophenyl)methyl]carbamoyl]-4-methyl-6,8-dioxo3,4,6,8, 12,12a-hexahydro-2H-pyrido[1',2':4,5]pyrazino[2, 1-b][1,3]oxazin-7 -olate (dolutegravir sodium, DN) 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 was characterized by a broad emission band at 346 nm. The results of the experiment showed that DN quench the intrinsic fluorescence of the protein as a result of static interaction in the HSA -DN system, which is confirmed by shifts in the difference UV spectra of the HSA -DN and the reduction of the binding constant for the HSA -DN system with increasing temperature.

The constant ($K_b = 9,82 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 298 K) and the number of binding sites of the HSA -DN 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 2,14 nm for the average distance r between DN (acceptor) and tryptophan residues of HSA (donor) was derived from the fluorescence resonance energy transfer. The overlap of the absorbance spectrum of DN with the fluorescence emission spectrum of HSA has been shown.

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 DN would be useful in pharmaceutical industry and clinical medicine.

Keywords: human serum albumin, fluorescence, dolutegravir sodium.

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. Peters T. *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1996, 432 p.
4. Kwon S., Carson J.H. *Fluorescence Quenching and Dequenching Analysis of RNA Interactions in Vitro and in Vivo*. Anal. Biochem., 1998, vol. 264, pp. 133-140. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1998.2846>
5. Khan S.N., Islam B., Yennamalli R., Sultan A., Subbarao N., Khan A.U. *Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies*. Europ. J. Pharm. Sci., 2008, vol. 35, no 5, pp. 371-382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2008.07.010>
6. Wang Y., Tang B., Zhang H., Zhou Q., Zhang G. *Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: Spectroscopic approach*. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 2009, vol. 94, pp. 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.013>
7. Gao X., Tang Y., Rong W., Zhang X., Zhao W., Zi Y. *Analysis of binding interaction between captopril and human serum albumin*. Amer. J. Anal. Chem., 2011, vol. 2, pp. 250-257. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2011.22030>
8. 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>
9. 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>
10. Rasoulzadeh F., Asgari D., Naseri A., Rashidi M.R. *Spectroscopic studies on the interaction between erlotinib hydrochloride and bovine serum albumin*. DARU, 2010, vol. 18, pp. 179-184.
11. Hossain M., Khan A.Y., Kumar G.S. *Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin*. PLOS One. 2011, vol. 6, no 4, pp. e18333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018333>
12. Wang C., Wu Q.-H., Wang Z., Zhao J. *Study of the interaction of carbamazepine with bovine serum albumin by fluorescence quenching method*. Anal. Sci., 2006, vol. 22, pp. 435-438. https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/22/3/22_3_435/_pdf
13. Roy A.S., Tripathy D.R., Chatterjee A., Dasgupta S. *A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin*. J. Biophys. Chem., 2010, vol. 1, pp. 141-152. doi:10.4236/jbpc.2010.13017
14. Varlan A., Hillebrand M. *Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy*. Molecules, 2010, vol. 15, pp. 3905-3919. doi:10.3390/molecules15063905
15. 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>
16. Jin J., Zhang X. *Spectrophotometric studies on the interaction between pazifloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme*. J. Lumin., 2008, vol. 128, pp. 81-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.05.008>
17. Zhang H.M., Wang Y.Q., Zhou Q.H. *Fluorimetric study of interaction of benzidine with trypsin*. J. Lumin., 2010, vol. 130, pp. 781-786. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2009.11.032>
18. Li D., Zhu J., Jin J. *Spectrophotometric studies on the interaction between nevadensin and lysozyme*. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, 2007, vol. 189, pp. 114-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.01.017>
19. Zhu J., Li D., Jin J., Wu L. *Binding analysis of farrerol to lysozyme by spectroscopic methods*. Spectrochim. Acta Part A, 2007, vol. 68, pp. 354-359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2006.11.045>
20. 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>
21. 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>

22. 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>
23. 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*. Pharmacology Pharmacy, 2015, vol. 6, no 2, pp. 94-101. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.62012>
24. 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>
25. 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>
26. 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.
27. Valeur B., Brochon J.C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy* 6th edn (Berlin : Springer), 1999, pp. 25–28.
28. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edn. New York:Springer, 2006, 954 p.
29. Sahoo B.K., Ghosh K.S., Dasgupta S. *Molecular interactions of isoxazolcurcumin with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies*. Biopolymers, 2009, vol. 91, pp. 108–119. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.21092>
30. Silva D., Cortez C.M., Cunha-Bastos J., Louro S.R.W. *Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin*. Toxicol. Lett., 2004, vol. 147, pp. 53–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.014>
31. Ross P. D., Subramanian S. *Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability*. Biochemistry, 1981, vol. 20, pp. 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>
32. 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>
33. Miller J.N. *Recent advances in molecular luminescence analysis*. Proc. Anal. Div. Chem. Soc., 1979, vol. 16, no. 7, pp. 203–208.
34. Wu P., Brand L. *Resonance energy transfer: Methods and applications*. Anal. Biochem., 1994, vol. 218, pp. 1–13.
35. Forster T. *Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz*. Ann. Phys., 1948, vol. 2, pp. 55–75.
36. 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>