

УДК 54.04: 665.939.1:543.42

**А. В. Егорова<sup>1</sup>, Г. В. Мальцев<sup>2</sup>, Ю. В. Скрипинец<sup>1</sup>, В. П. Антонович<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины

Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

<sup>2</sup>ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

## СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНДОМЕТАЦИНА И ДАКЛАТАСВИРА ДИГИДРОХЛОРИДА С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

Исследовано взаимодействие между индометацином (ИНД), даклатасвира дигидрохлоридом (ДАК) и сывороточным альбумином человека (САЧ) методом флуоресценции в модельных физиологических условиях. Результаты эксперимента показывают, что собственная флуоресценция ИНД и ДАК проявляется в той же самой области спектра, что и собственная флуоресценция белка. В случае ИНД можно выбрать небольшой участок спектра, смещенный относительно максимума, в котором проявляется тушение флуоресценции белка. В случае ДАК происходит полное наложение его спектра эмиссии на собственную флуоресценцию белка.

Установлено, что в результате статического взаимодействия в системах САЧ-ИНД и САЧ-ДАК происходит тушение собственной флуоресценции ИНД и ДАК белком. Показана возможность определения констант связывания САЧ с молекулами лекарственных веществ по тушению их собственной флуоресценции. Установлены константы и число мест связывания в системах САЧ-ИНД и САЧ-ДАК. Согласно теории резонансного переноса энергии установлено среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами для систем САЧ-ИНД(ДАК).

**Ключевые слова:** сывороточный альбумин человека, флуоресценция, индометацин, даклатасвир.

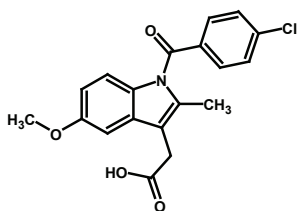
Флуоресцентная спектроскопия является одним из эффективных методов изучения связывания лекарственных веществ («малых» молекул) с белками, что является важным для целей биохимии и медицины [1–3]. При изучении взаимодействия между белком и «малой» молекулой *in vitro* в качестве модели используют сывороточный альбумин человека (САЧ). 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 [4].

В литературе имеется ряд сообщений, посвященных подробному изучению связывания метаболитов, лекарств, красителей, жирных кислот, биоактивных веществ с протеинами [5–8], основанному на эффекте статического тушения собственной флуоресценции САЧ «малыми» молекулами, которые выступают в роли тушителя.

Однако такой способ изучения взаимодействия становится непригоден, если происходит перекрывание (частичное или полное) спектров флуоресценции биомакромолекулы и лиганда. Такой эффект был обнаружен при изучении взаимодействия САЧ с лекарственными препаратами индометацином (ИНД) и даклатасвиром (ДАК).

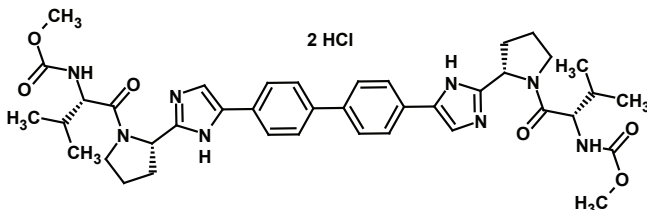
Целью данной статьи было спектроскопическое исследование взаимодействия субстанций ИНД и ДАК с САЧ, а также определение параметров связывания: оценка константы связывания, установления количества мест связывания и расстояния между донором и акцептором.

Индометацин – 2-{1-[(4-хлорфенил)карбонил]-5-метокси-2-метил-1*H*-индол-3-ил}уксусная кислота, нестероидный противовоспалительный препарат, производное индолилуксусной кислоты, из класса ингибиторов фермента циклооксигеназы:



Индометацин (ИНД)

Даклатасвира дигидрохлорид – ((1*S*)-1-((2*S*)-[5-(4'-{2-[(2*S*)-1-((2*S*)-2-метоксикарбонил-амино-3-метил-бутирил)пирролидин-2-ил]-3*H*-имидазол-4-ил]дифенил-4-ил)-1*H*-имидазол-2-ил]пирролидин-1-карбонил}-2-метил-пропил) карбаминовой кислоты метиловый эфир дигидрохлорид, препарат для лечения гепатита С (HCV), пангенотипичный ингибитор белка NS5A, I волны I поколения:



Даклатасвира дигидрохлорид (ДАК)

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

В качестве рабочих стандартных образцов (PCO) использовали индометацин, производства (CAS 53-86-1, Sigma-Aldrich) и фармацевтическую субстанцию даклатасвира дигидрохлорида, производства «Optimus Drugs» (Индия).

Стандартные растворы ИНД и ДАК ( $1 \times 10^{-3}$  моль/л) готовили растворением их точных навесок в воде с перемешиванием на магнитной мешалке (для ИНД доводили pH раствора до 7,0 с помощью 0,1 М раствора натрия гидроксида). Разбавлением водой готовили рабочие растворы ИНД и ДАК ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л).

Стандартный раствор САЧ (CAS 70024-90-7, Sigma-Aldrich) ( $1 \times 10^{-4}$  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  $36\ 600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{см}^{-1}$  при 280 нм [9].

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 кюветах.

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).

#### Расчет констант связывания

Тушение флуоресценции происходит по статическому механизму, т. е. за счет обратимого связывания протеина ( $P$ ) с  $n$  молекулами лиганда ( $L$ ) в основном состоянии:



Процесс связывания характеризуется константой равновесия  $K$ , которая выражается через равновесные концентрации по закону действующих масс:

Общие (аналитические) концентрации реагентов ( $[P]_t$  и  $[L]_t$ ) связаны с их равновесными концентрациями уравнениями материального баланса:

$$[P]_t = [P] + [PL_n], \quad (3)$$

$$[L]_t = [L] + n \cdot [PL_n]. \quad (4)$$

Относительное изменение интенсивности флуоресценции  $F$  будет пропорционально изменению концентрации флуорофора.

Рассмотрим два случая тушения флуоресценции.

Первый случай: флуорофором является протеин, тушителем – лиганд, тогда:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[P]}{[P]_t}. \quad (5)$$

В этом случае логарифмическая линеаризация закона действующих масс приводит к следующему линейному выражению:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \cdot \lg [L], \quad (6)$$

где:  $F_0$  – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя;

$F$  – интенсивность флуоресценции у присутствии тушителя.

Учитывая уравнение материального баланса (4), выражение для расчета константы связывания приобретает следующий вид:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \cdot \lg \left( [L]_t - n \cdot [P]_t \cdot \frac{F_0 - F}{F_0} \right). \quad (7)$$

Полученное уравнение (7) трансцендентно относительно коэффициента  $n$ . Для расчета этой величины, вначале, в выражение, стоящее под логарифмом, вносится некоторое фиксированное значение  $n'$ , затем регрессионным анализом оценивается значение  $n$ , как углового коэффициента линейной регрессии. После чего параметр  $n'$  подбирается итерационным способом так, чтобы выполнялось условие:

$$(n' - n)^2 \Rightarrow \min. \quad (8)$$

*Второй случай:* флуорофором является лиганд, тушителем – протеин, тогда:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[L]}{[L]}, \quad (9)$$

Логарифмирование уравнения (2) и совместное решение уравнений (3,4,9) относительно равновесных концентраций приводит к линеаризации выражения зависимости константы связывания  $K$  от общих концентраций  $[P]_t$  и  $[L]_t$ , числа мест связывания  $n$  и интенсивности флуоресценции:

$$\lg \frac{[L]_t \cdot (F_0 - F)}{n \cdot [P]_t \cdot F_0 - [L]_t \cdot (F_0 - F)} = \lg K + n \cdot \lg [L]_t \cdot \frac{F}{F_0}. \quad (10)$$

Уравнение (10), так же как и уравнение (7), является трансцендентным относительно коэффициента  $n$ . Расчет этой величины производится по процедуре, описанной для первого случая. Десятичный логарифм константы связывания, как в первом, так и во втором случае, определяется оценкой свободного члена линейной регрессии, т.е., отрезком, отсекаемым на оси ординат регрессионной прямой к нулевой абсциссе.

## МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

### *Первый случай*

Изменение интенсивности собственной флуоресценции САЧ при добавлении ИНД: в мерные колбы вместимостью 10,0 мл вносят по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 мл рабочего раствора ИНД ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). В каждую колбу добавляют по 1,0 мл трис-НСI буферного раствора pH 7,5; 1,0 мл раствора САЧ ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). Доводят водой до 10,0 мл и перемешивают. Параллельно готовят раствор контрольной пробы, содержащий все компоненты, кроме ИНД. Через 5 мин измеряют интенсивность люминесценции по  $\lambda_{\text{эмис}} = 330$  нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) в каждой точке ( $F$ ) и интенсивность люминесценции контрольной пробы ( $F_0$ ).

Изменение интенсивности собственной флуоресценции САЧ при добавлении ДАК: в мерные колбы вместимостью 10,0 мл вносят по 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0 мл рабочего раствора ДАК ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). В каждую колбу добавляют по 1,0 мл трис-НСI буферного раствора pH 7,5; 0,1 мл раствора САЧ ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). Доводят водой до 10,0 мл и перемешивают. Параллельно готовят раствор контрольной пробы, содержащий все компоненты, кроме ДАК. Через 5 мин измеряют интенсивность люминесценции по  $\lambda_{\text{эмис}} = 330$  нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) в каждой точке ( $F$ ) и интенсивность люминесценции контрольной пробы ( $F_0$ ).

*Второй случай* (изменения интенсивности собственной флуоресценции ИНД и ДАК при добавлении САЧ): в мерные колбы вместимостью 10,0 мл вносят по 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 5 мл рабочего раствора САЧ ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). В каждую колбу добавляют по 1,0 мл трис-НСI буферного раствора pH 7,5; 2,0 мл раствора ИНД (или ДАК) ( $1 \times 10^{-4}$  моль/л). Доводят водой до 10,0 мл и перемешивают. Параллельно готовят раствор контрольной пробы, содержащий все компоненты, кроме САЧ. Через 5 мин измеряют интенсивность люминесценции по  $\lambda_{\text{эмис}} = 390$  нм для ИНД и  $\lambda_{\text{эмис}} = 325$  нм для ДАК ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) в каждой точке ( $F$ ) и интенсивность люминесценции контрольной пробы ( $F_0$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Спектры тушения флуоресценции

Взаимодействие ИНД с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции белка при добавлении ИНД (рис. 1а). При увеличении концентрации ИНД полоса флуоресценции САЧ перекрывается собственной флуоресценцией ИНД. Наблюдается небольшой участок спектра, где интенсивность флуоресценции САЧ заметно уменьшается.

Во втором случае (рис. 1б) наблюдалось монотонное падение интенсивности собственной флуоресценции ИНД при добавлении САЧ практически на всем участке спектра.

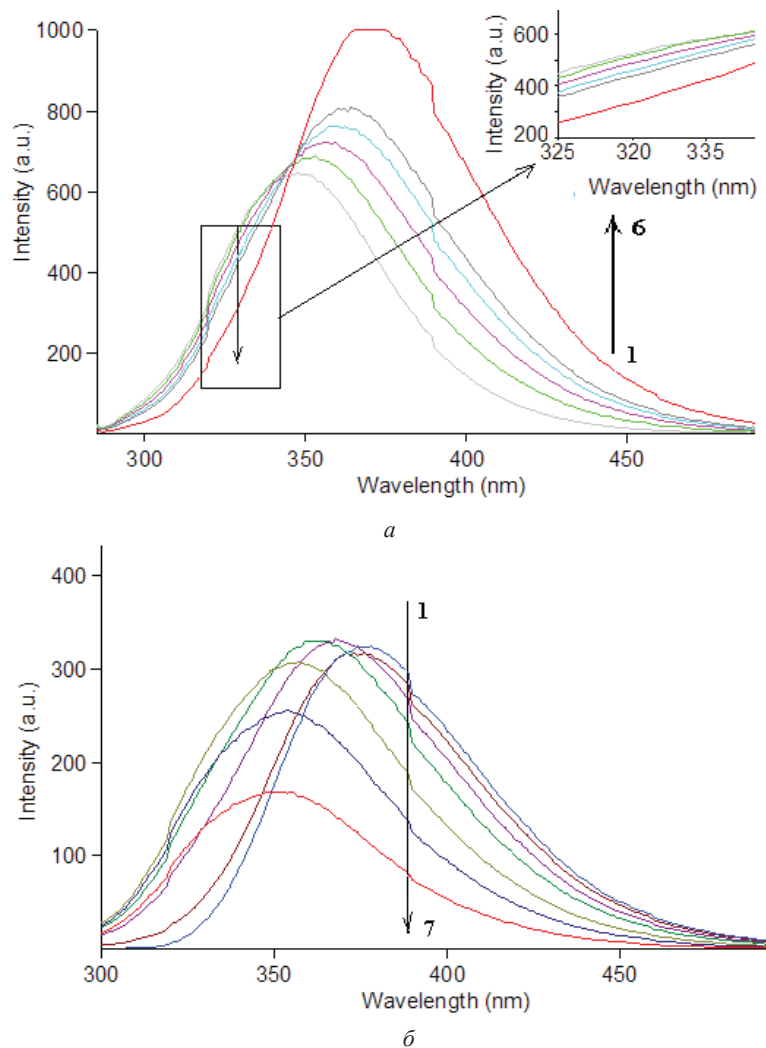


Рис. 1. Спектры флуоресценции САЧ в присутствии различных количеств ИНД (а) и спектры флуоресценции ИНД в присутствии различных количеств САЧ (б)

На рис. 2 представлены графики зависимости  $\lg Y$  от  $\lg X$ , где  $Y$  и  $X$  определяются по уравнениям (6) и (10) в первом и во втором случаях соответственно. Они демонстрируют удовлетворительные линейные корреляции, из которых рассчитаны  $\lg K$  и количества мест связывания ( $n$ ) в системе САЧ-ИНД для различных способов тушения (табл. 1).

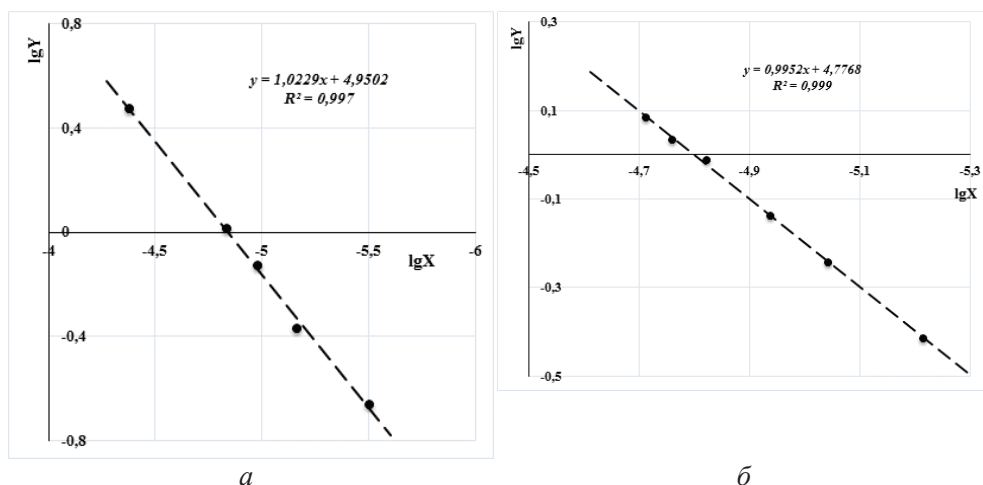


Рис. 2. Логарифмическая линейаризация закона действующих масс для расчета  $\lg K$  и числа мест связывания САЧ-ИНД, по тушению флуоресценции САЧ (а) и по тушению флуоресценции ИНД (б).

Таблица 1  
Значения  $\lg K$  и количества мест связывания ( $n$ ) в системе САЧ-ИНД для различных способов тушения

способ тушения	$\lg K$	$n$
тушение флуоресценции САЧ	4,95	1,02
тушение флуоресценции ИНД	4,78	1,00
тушение флуоресценции САЧ [10]	4,74	1,15

Результаты эксперимента показывают, что собственная флуоресценция ДАК проявляется в той же самой области спектра, что и собственная флуоресценция белка и происходит полное наложение его спектра эмиссии на собственную флуоресценцию белка (рис. 3а).

Взаимодействие ДАК с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции ДАК при добавлении САЧ (рис. 3б). Эмиссия ДАК характеризуется широкой полосой с максимумом при длине волны 388 нм. При увеличении концентрации САЧ интенсивность флуоресценции ДАК заметно уменьшается. Анализ изменения эмиссии ДАК при различных концентрациях САЧ проводили по уравнению (10). Полученные значение  $\lg K$  и количества мест связывания составили:  $\lg K = 4,91$  и  $n = 1,00$ .

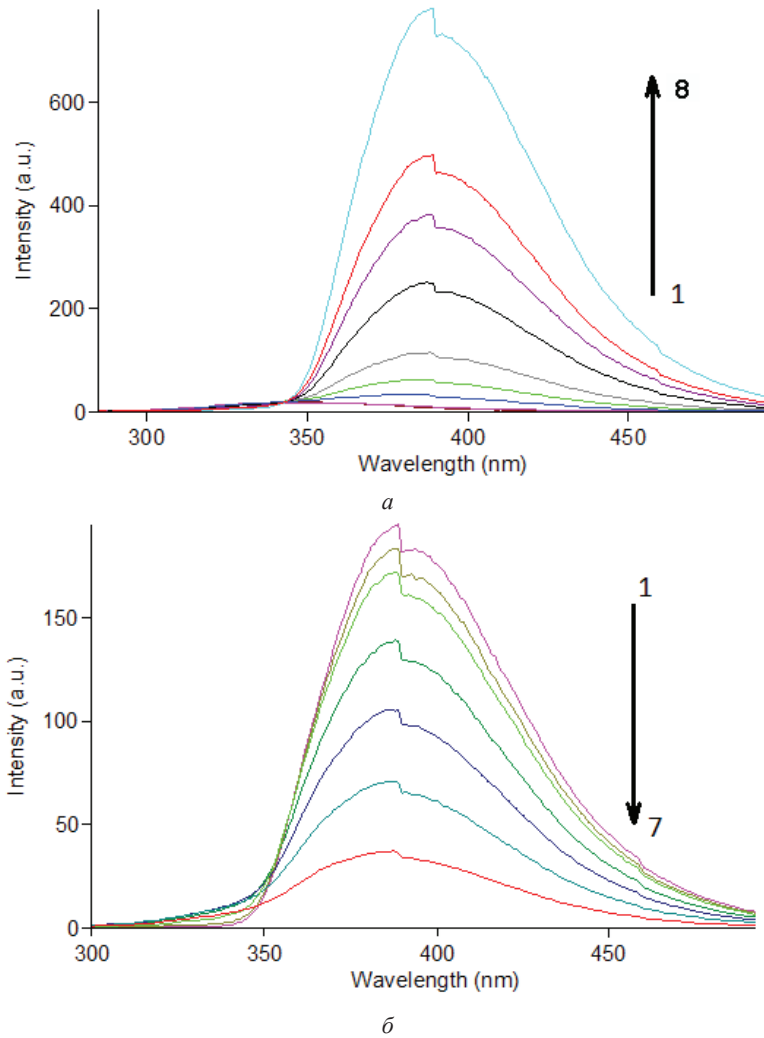


Рис. 3. Спектры флуоресценции САЧ в присутствии различных количеств ДАК (а) и спектры флуоресценции ДАК в присутствии различных количеств САЧ (б)

На рис. 4 представлен график в координатах уравнения (10), из которого рассчитаны  $IgK$  и количества мест связывания ( $n$ ) в системе САЧ-ДАК.

#### 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 [11]. Передача энергии может происходить при следующих условиях: ког-

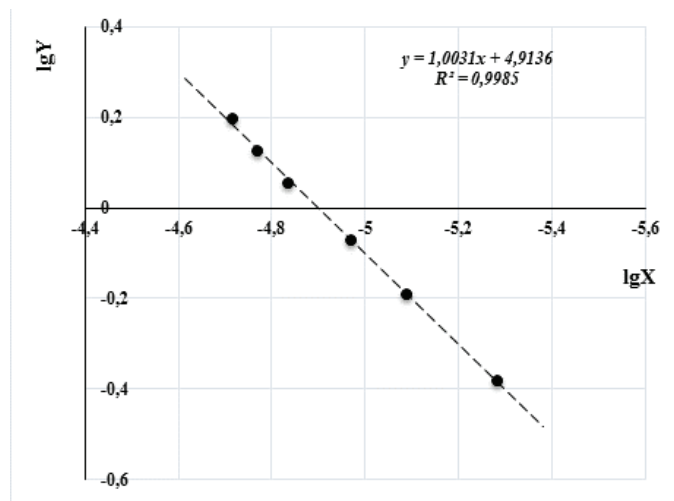


Рис. 4. Логарифмическая линейризация закона действующих масс для расчета  $lgK$  и числа мест связывания САЧ-ДАК по тушению флуоресценции ДАК

да 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 ИНД (ДАК) и САЧ может быть использована для оценки расстояния между ними с использованием FRET. Перекрытие спектра поглощения ИНД и спектра флуоресценции САЧ приведено на рис. 5а, а перекрытие спектра поглощения САЧ и спектра флуоресценции ИНД приведено на рис. 5б.

Согласно теории безызлучательного резонансного переноса энергии Ферстера [12], 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:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (11)$$

где:  $r$  – расстояние между акцептором и донором;

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

Величина  $R_0$  рассчитывается по следующему уравнению:

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-25} \cdot K^2 \cdot n \cdot \phi \cdot J \quad (12)$$

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  $K^2 = 2/3$ );



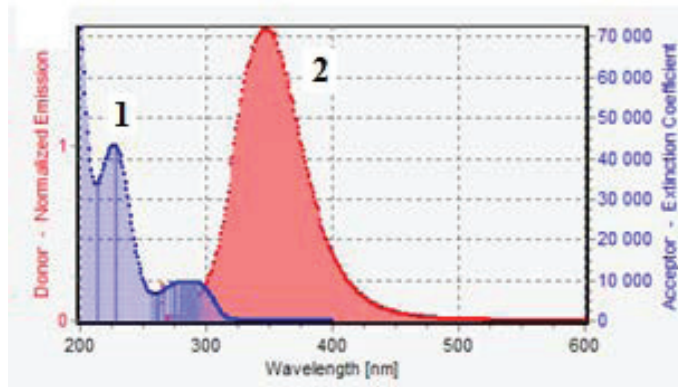
$n$  – показатель преломления;  
 $\varphi$  – квантовый выход флуоресценции донора;  
 $J$  – интеграл перекрытия спектра излучения донора и спектра поглощения акцептора (рис. 5), который определяется по формуле:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} \quad (13)$$

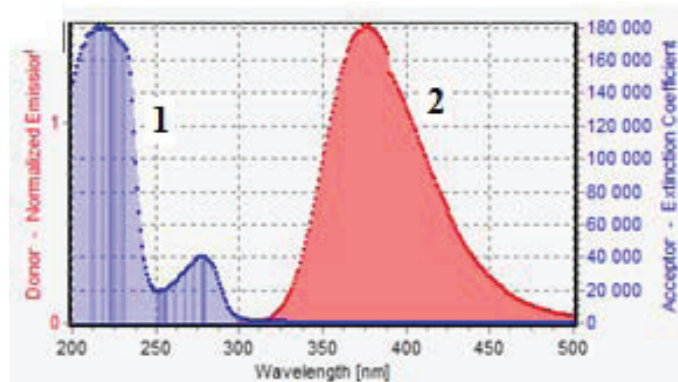
где:  $F(\lambda)$  – нормированная интенсивность флуоресценции донора при длине волны  $\lambda$ ;

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

В данном случае  $K^2 = 2/3$ ,  $n = 1,336$  и  $\varphi = 0,118$  [13]. Следовательно, из уравнений (11)–(13) вычислены параметры, представленные в табл. 2.



а



б

Рис. 5. Перекрытие спектра поглощения ИНД (1) и спектра флуоресценции САЧ (2) (а) и перекрытие спектра поглощения САЧ (1) и спектра флуоресценции ИНД (2) (б)  
 $(C_{\text{САЧ}}/C_{\text{ИНД}} = 1; 1 \times 10^{-5} \text{ моль/л, } T = 298 \text{ К, } \lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм})$

Таблица 2

## Параметры связывания с САЧ

Малые молекулы	$J$ (см <sup>3</sup> ·л·моль <sup>-1</sup> )	$R_0$ (нм)	$R$ (нм)
ИНД (тушение флуоресценции САЧ)	$5,41 \cdot 10^{-16}$	1,51	1,25
ИНД (тушение флуоресценции ИНД)	$9,98 \cdot 10^{-16}$	1,65	1,44
ДАК (тушение флуоресценции ДАК)	$1,04 \cdot 10^{-15}$	1,69	1,42

Расстояние ( $r$ ) между САЧ и ИНД(ДАК) 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 ИНД(ДАК), что соответствует механизму статического тушения.

## ВЫВОДЫ

Впервые показана возможность определения констант связывания САЧ с молекулами лекарственных веществ по тушению их собственной флуоресценции.

Проведено спектроскопическое изучение взаимодействия индометацина с сывороточным альбумином человека. Показано, что САЧ тушит собственную флуоресценцию ИНД в результате статического взаимодействия в системе САЧ-ИНД. Установлены константа и число мест связывания для системы САЧ-ИНД по тушению собственной флуоресценции индометацина. Показано, что значения констант связывания, определенные по тушению САЧ и по тушению ИНД, имеют удовлетворительную сходимость.

Проведено спектроскопическое изучение взаимодействия даклатавира дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека. Показано, что САЧ тушит собственную флуоресценцию ДАК в результате статического взаимодействия в системе САЧ-ДАК. Установлены константа и число мест связывания для системы САЧ-ДАК по тушению собственной флуоресценции даклатавира дигидрохлорида. Согласно теории резонансного переноса энергии установлены средние расстояния между донорными и акцепторными молекулами для систем САЧ-ИНД и САЧ-ДАК.

Такое стандартизированное изучение взаимодействия между САЧ и «малыми» молекулами является полезным для фармацевтической промышленности и клинической медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

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. 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>
4. Peters T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications; Academic Press: San Diego, CA, USA. – 1996. – 432 p.

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. Review on Interaction of Serum Albumin with Drug Molecules Res. Reviews. // *J. Pharmacol. Toxicolog. Studies.* – 2016. – Vol. 4, N 2. – P.7-16.
9. 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.
10. Bogdan M., Pirnau A., Floare C., Bugeac C. Binding interaction of indomethacin with human serum albumin. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 47. – P. 981 – 984.
11. Wu P., Brand L. Resonance energy transfer: Methods and applications // *Anal. Biochem.* – 1994. – Vol. 218. – P. 1–13.
12. Forster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz // *Ann. Phys.* – 1948. – Vol. 2. – P. 55–75.
13. 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 18.01.2018

**А. В. Єгорова<sup>1</sup>, Г. В. Мальцев<sup>2</sup>, Ю. В. Скрипинець<sup>1</sup>, В. П. Антонович<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

## **СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ІНДОМЕТАЦИНУ ТА ДАКЛАТАСВІРУ ДИГІДРОХЛОРИДУ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ ЛЮДИНИ**

Флуоресцентна спектроскопія є одним з ефективних методів вивчення зв'язування лікарських речовин з білками, що є важливим для цілей біохімії та медицини. При вивченні взаємодії *in vitro* в якості моделі використовують сироватковий альбумін людини (САЛ), завдяки присутності в його складі залишків триптофану, які характеризуються високою чутливістю до оточення. Вивчення зв'язування засновано на ефекті статичного гасіння власної флуоресценції САЛ молекулами лікарських препаратів, які виступають в ролі гасників. Однак, такий спосіб вивчення взаємодії стає непридатним, якщо відбувається перекривання (часткове або повне) спектрів флуоресценції протеїну та молекули гасника.

Досліджено взаємодію між індометацином (ІНД), даклатасвіром дигідрохлоридом (ДАК) та САЛ методом флуоресценції в модельних фізіологічних умовах. Результати експерименту показують, що власна флуоресценція ІНД і ДАК проявляється в тій же самій області спектру, що і власна флуоресценція протеїну. У разі ІНД можна вибрати невелику частину спектру, зміщену відносно максимуму, в якому проявляється гасіння флуоресценції протеїну. У разі ДАК відбувається повне накладення його спектру емісії на власну флуоресценцію протеїну.

Встановлено, що в результаті статичної взаємодії в системах САЧ-ІНД та САЧ-ДАК відбувається гасіння власної флуоресценції ІНД і ДАК протеїном. Показана можливість визначення констант зв'язування САЧ з молекулами лікарських речовин по гасінню їх власної флуоресценції. Встановлено константи та число місць зв'язування в системах САЧ-ІНД(ДАК). Відповідно до теорії резонансного переносу енергії встановлено інте-

грал перекиривання, ферстеровський радіус ( $R_0$ ), середню відстань між донорними та акцепторними молекулами ( $r$ ) для систем САЧ-ІНД(ДАК).

Оскільки фармацевтичні фірми на першому етапі розробки нового лікарського засобу потребують стандартизований скринінг для його зв'язування з білками, подібне вивчення взаємодії САЛ та ІНД(ДАК) має бути корисним для фармацевтичної промисловості та клінічної медицині.

**Ключові слова:** сироватковий альбумін людини, флуоресценція, індометацин, даклатасвіру дигідрохлорид.

**A. V. Yegorova<sup>1</sup>, G. V. Maltsev<sup>2</sup>, Yu. V. Scrypynets<sup>1</sup>, V. P. Antonovich<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>«INTERCHEM», Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

## **SPECTROSCOPIC STUDY OF INTERACTION OF INDOMETHACIN AND DACLATASVIR DIGIDROCHLORIDE WITH HUMAN SERUM ALBUMIN**

Fluorescence spectroscopy is one of the most effective methods for studying the binding of drugs to proteins, which is important for the purposes of biochemistry and medicine. When studying the interaction *in vitro*, human serum albumin (HSA) is used as a model, due to the presence of tryptophan residues in its composition, which are characterized by high sensitivity to the environment. The study of binding is based on the effect of static quenching of the intrinsic fluorescence of HSA by molecules of drugs that act as quenchers. However, such a method of studying the interaction becomes unsuitable if there is overlap (partial or complete) of the fluorescence spectra of the protein and the quenching molecule.

Under physiological conditions, *in vitro* the interaction between indomethacin (IND), daclatasvir dihydrochloride (DAC) and HSA by the by fluorescence emission spectroscopy was studied. The results of the experiment show that the intrinsic fluorescence of the IND and DAC is manifested in the same spectral region as the intrinsic fluorescence of the protein. In the case of an IND, a small site of the spectrum shifted relative to the maximum can be selected, in which quenching of the fluorescence of the protein is observed. In the case of DAC, its emission spectrum is completely superimposed on the intrinsic fluorescence of the protein. It is established that as a result of static interaction in the HSA-IND and HSA-DAC systems, the intrinsic fluorescence of IND and DAC by protein is quenched. The possibility of determining the binding constants of HSA with molecules of drug substances by quenching their intrinsic fluorescence is shown. The constants and number of binding sites in the HSA-IND and HSA-DAC systems are established. It is shown that the values of the binding constants, determined by quenching the HSA and by quenching the IND, have satisfactory similarity.

A value for the average distance  $r$  between IND(DAC) and HSA was derived from the fluorescence resonance energy transfer.

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 and IND (DAC) would be useful in pharmaceutical industry and clinical medicine.

**Key words:** human serum albumin, fluorescence, indomethacin, daclatasvir digidrochloride.

## 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, 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. *Review on Interaction of Serum Albumin with Drug Molecules Research and Reviews*. J. Pharmacol. Toxicolog. Studies. 2016, vol. 4, no 2, pp.7-16.
9. 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.
10. Bogdan M., Pirnau A., Floare C., Bugeac C. *Binding interaction of indomethacin with human serum albumin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 2008, vol. 47, pp. 981 - 984.
11. Wu P., Brand L. *Resonance energy transfer: Methods and applications*. Anal. Biochem., 1994, vol. 218, pp. 1-13.
12. Forster T. *Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz*. Ann. Phys., 1948, vol. 2, pp. 55-75.
13. 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>