

Study of Interaction of some Benzodiazepines with Human Serum Albumin by Fluorescent Method

A.V. Yegorova^{*†}, G.V. Maltsev[‡], Y. V. Scrypynets[†], S.N. Kashutsky[‡], V. P. Antonovich[†]

[†] A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorskaya doroga, 86, 65080, Odessa, Ukraine; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] "INTERCHEM SLC", Lustdorskaya doroga, 86, 65080, Odessa, Ukraine

Received: December 27, 2017; Accepted: January 30, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.18-28

Fluorescence spectroscopy is one of the most effective methods for studying intermolecular interactions that reflect the change in the environment of a fluorophore. It helps to establish the binding of small molecules (drugs) to proteins. In the model physiological conditions, the interaction between certain benzodiazepines (BD) and human serum albumin (HSA) by fluorescence in combination with the method of ultraviolet spectroscopy was studied. The results of the experiment shows that the BD quench the intrinsic fluorescence of protein as a result of static interaction in the HSA - BD systems, which is confirmed by the shifts in the difference UV spectra of the HSA - BD and the reduction of binding constants for the HSA - BD systems with increasing temperature. The interaction parameters, such as the binding constant (K_A), enthalpy change (ΔH°) and entropy change (ΔS°) were determined. The average distance (r) between DZP and tryptophan residue of HSA was calculated using theory of resonance energy transfer. It is established that the average distance between donor and acceptor molecules for HSA - BD systems is from 1.32 nm to 1.79 nm. Synchronous fluorescence spectra of BD at $\Delta\lambda = 60$ nm shows a bathochromic shift (from 3 nm to 6 nm), which indicates the presence of conformation changes of protein near the tryptophan residue.

Keywords: human serum albumin, fluorescence, benzodiazepines

Изучение взаимодействия некоторых бенздиазепинов с сывороточным альбумином человека флуоресцентным методом

А.В. Егорова^{*†}, Г.В. Мальцев[‡], Ю.В. Скрипинец[†], С.Н. Кашуцкий[‡], В.П. Антонович[†]

[†] Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

Поступила: 27 декабря 2017 г; Принята: 30 января 2018 г

DOI: 10.17721/moca.2018.18-28

Флуоресцентная спектроскопия является одним из эффективных методов изучения межмолекулярных взаимодействий, отражающих изменение окружения флуорофора. Она помогает установить связывание малых молекул (лекарственных веществ) с белками. В модельных физиологических условиях исследовано взаимодействие между некоторыми бенздиазепинами (БД) и сывороточным альбумином человека (САЧ) методом флуоресценции в сочетании с методом ультрафиолетовой спектроскопии. Результаты эксперимента показывают, что БД тушат собственную флуоресценцию белка в результате статического взаимодействия в системах САЧ-БД, что подтверждается сдвигами в разностных УФ-спектрах САЧ-БД и уменьшением констант связывания для систем САЧ-БД с повышением температуры. Установлены константы и число мест связывания систем САЧ-БД. Определены параметры взаимодействия, такие как константа связывания (K_A), изменение энтальпии (ΔH°) и изменение энтропии (ΔS°). Среднее расстояние (r) между БД и триптофановым остатком САЧ рассчитывали с использованием теории резонансного переноса энергии. Установлено, что среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами для систем САЧ-БД составляют от 1.32 нм до 1.79 нм. Синхронные спектры флуоресценции БД при $\Delta\lambda = 60$ нм показывают bathochromic сдвиг (от 3 нм до 6 нм), что свидетельствует о наличии конформационных изменений белка около остатка триптофана.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, флуоресценция, бенздиазепины

Аналитическая химия (в частности, люминесцентный анализ) в приложении в биохимическом и фармацевтическим задачам позволяет установить как сам факт взаимодействия

«малых молекул» (в том числе ксенобиотиков, лекарственных препаратов (ЛП)) с протеинами (чаще всего с бычьим сывороточным альбумином (БСА) или сывороточным альбумином человека (САЧ)), так и охарактеризовать природу этого взаимодействия (определить расстояния между донором и акцептором, константы связывания, выявить характер сил связывания), вплоть до предположений о местах связывания (в чем существенную помощь может оказать молекулярный докинг) [1].

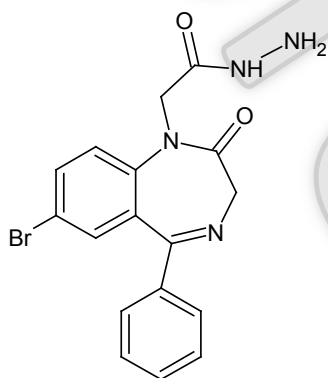
При изучении взаимодействия между белком и лекарственным веществом *in vitro* в качестве модели используют сывороточный альбумин человека (САЧ). Он представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 585 аминокислотных остатков [2]. САЧ является основным транспортным белком кровяного русла, способным 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 межмолеку-

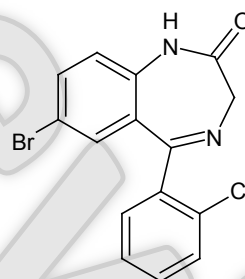
лярных взаимодействий, отражающих изменение окружения флуорофора. Она помогает установить связывание малых молекул (лекарственных веществ) с белками [4].

О возможности отнесения этого раздела науки к аналитической химии свидетельствуют многочисленные публикации в соответствующих журналах. 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 [5–26].

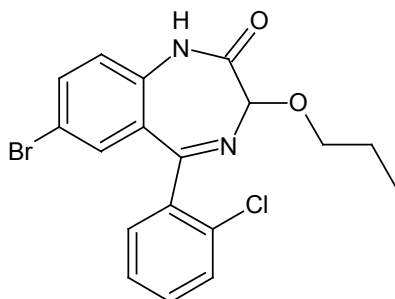
Целью данной статьи было флуоресцентное исследование взаимодействия производных бензодиазепинового ряда (БД): 1) 1-(гидразинокарбонил)-метил-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-он (гидазепам); 2) 7-бром-5-(*o*-хлорфенил)-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-он (феназепам); 3) 7-бром-3-пропокси-5-(2-хлорфенил)-1,3-дигидробензо[*e*][1,4]дiazepин-2-он (пропоксазепам); 4) моно-[7-бром-2-оксо-5-(2-хлорфенил)-2,3-дигидро-1Н-бензо[1,4]дiazepин-3-ил]сукцината моногидрата (левана) и сывороточного альбумина человека, а также определение параметров связывания: оценка констант связывания, установления количества мест связывания и расстояний между донором (САЧ) и акцептором (БД).



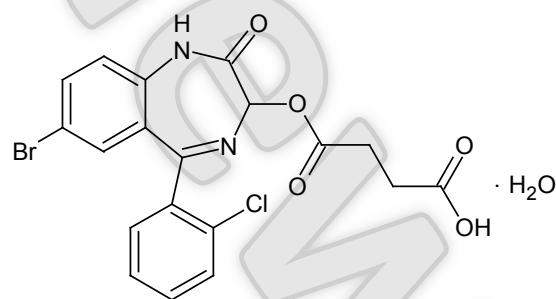
гидазепам (ГИД)



феназепам (ФЕН)



пропоксазепам (ПРП)



левана (ЛЕВ)

Экспериментальная часть

Материалы и методы

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

В качестве рабочих стандартных образцов (РСО) бенздиазепинов использовали фармацевтические субстанции гидазепама, феназепама, пропоксазепама, левана производства ОДО «ИНТЕРХИМ».

Стандартные растворы БД (10^{-3} моль/л) готовили растворением их точных навесок в этиловом спирте с перемешиванием на магнитной мешалке. Разбавлением водой готовили рабочие растворы БД (10^{-4} 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 [27].

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 объем раствора до 1000.0 мл водой и перемешивали.

Аппаратура

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 (Mettmert GmbH, Германия).

Методика определения

Испытуемый раствор. 1.0 мл трис-НСI буферного раствора, 1.0 мл стандартного раствора САЧ и соответствующее количество раствора БД помещают в мерную колбу вместимостью 10.0 мл, доводят объем 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 стандартного раствора САЧ помещают в мерную колбу вместимостью 10.0 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Растворы выдерживают в течение 5 мин перед измерением.

Результаты и их обсуждение

Электронные спектры поглощения

Молекулярная абсорбционная спектроскопия является простым и подходящим методом, используемым для исследования структурных изменений и изучения различных видов взаимодействия [28]. В спектрах производных БД наблюдаются два пика с максимумами при: 231 нм и 309 нм для ГИД (рис. 1); 231 нм и 317 нм для ФЕИ; 233 нм и 318 нм для ПРП; 233 нм и 322 нм для ЛЕВ.

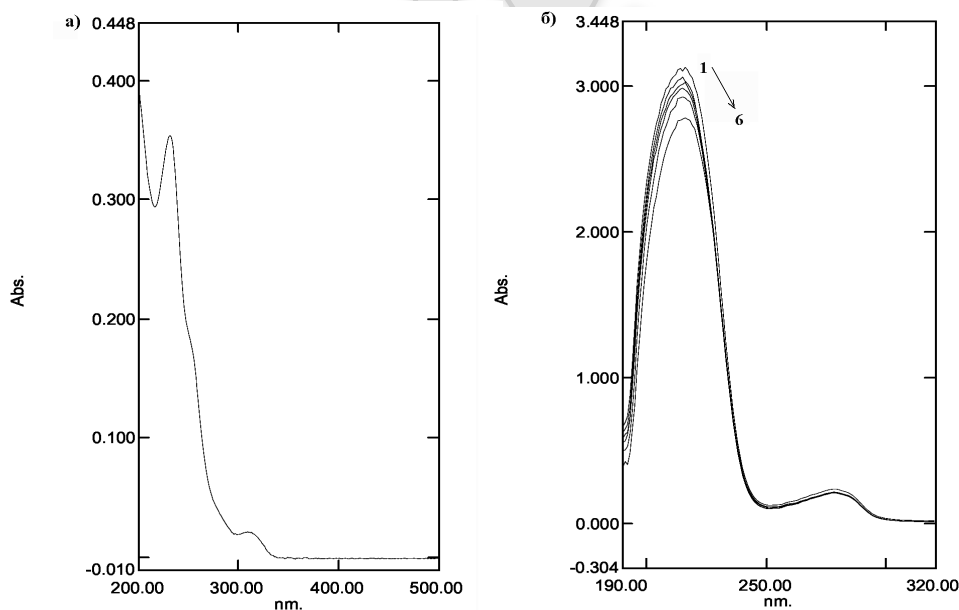


Рисунок 1. Спектр поглощения ГИД ($C_{\text{ГИД}} = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л) (а); влияние ГИД на УФ-спектры поглощения САЧ (б) ($T = 298\text{ K}$, $\text{pH } 7.5$, $C_{\text{САЧ}} = 5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ГИД}} \times 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1.0; 2.0; 5.0; 10.0; 20.0 (2-6 – разностный спектр поглощения между ГИД - САЧ и ГИД).

Для первоначальной проверки механизма тушения измеряли и регистрировали спектры УФ-поглощения (САЧ) и ((САЧ + БД) - БД). Как показано на рис. 16 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 остатков ароматических аминокислот триптофана (Трп), тирозина (Тир) и фенилаланина (Фен) [9]. При добавлении БД интенсивность пика при 220 нм уменьшается с батохромным смещением примерно на 3 нм, что указывает на изменение в микроокружении вокруг амидных связей в белке, что подтверждает наличие взаимодействия между БД 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 [29].

Взаимодействие БД с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции белка при добавлении БД (рис. 2). Эмиссия САЧ характеризуется широкой полосой при 346 нм. При увеличении концентрации БД интенсивность флуоресценции САЧ заметно уменьшается. Анализ изменения эмиссии САЧ при различных концентрациях БД 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].

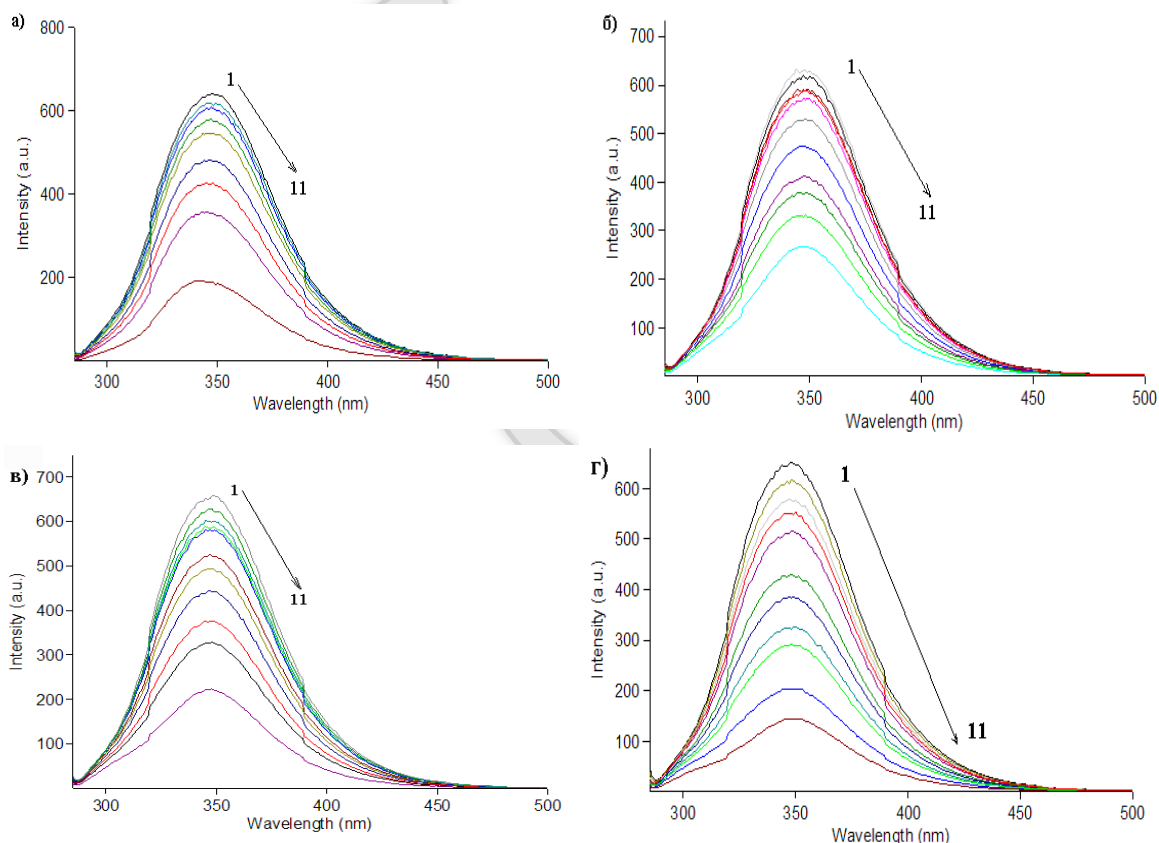


Рисунок 2. Спектры флуоресценции САЧ в присутствии различных количеств БД: ГИД (а), ФЕН (б), ПРП (в) и ЛЕВ (г) ($C_{\text{БД}} \times 10^{-6}$ моль/л, кривые (1-11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, pH 7.5, $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм, $C_{\text{САЧ}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К).

На рис. 3 представлены графики зависимости F_0/F от концентрации БД при разных темпера-

турах, из которых установлены константы тушения Штерна-Фольмера K_{sv} (таблица 1).

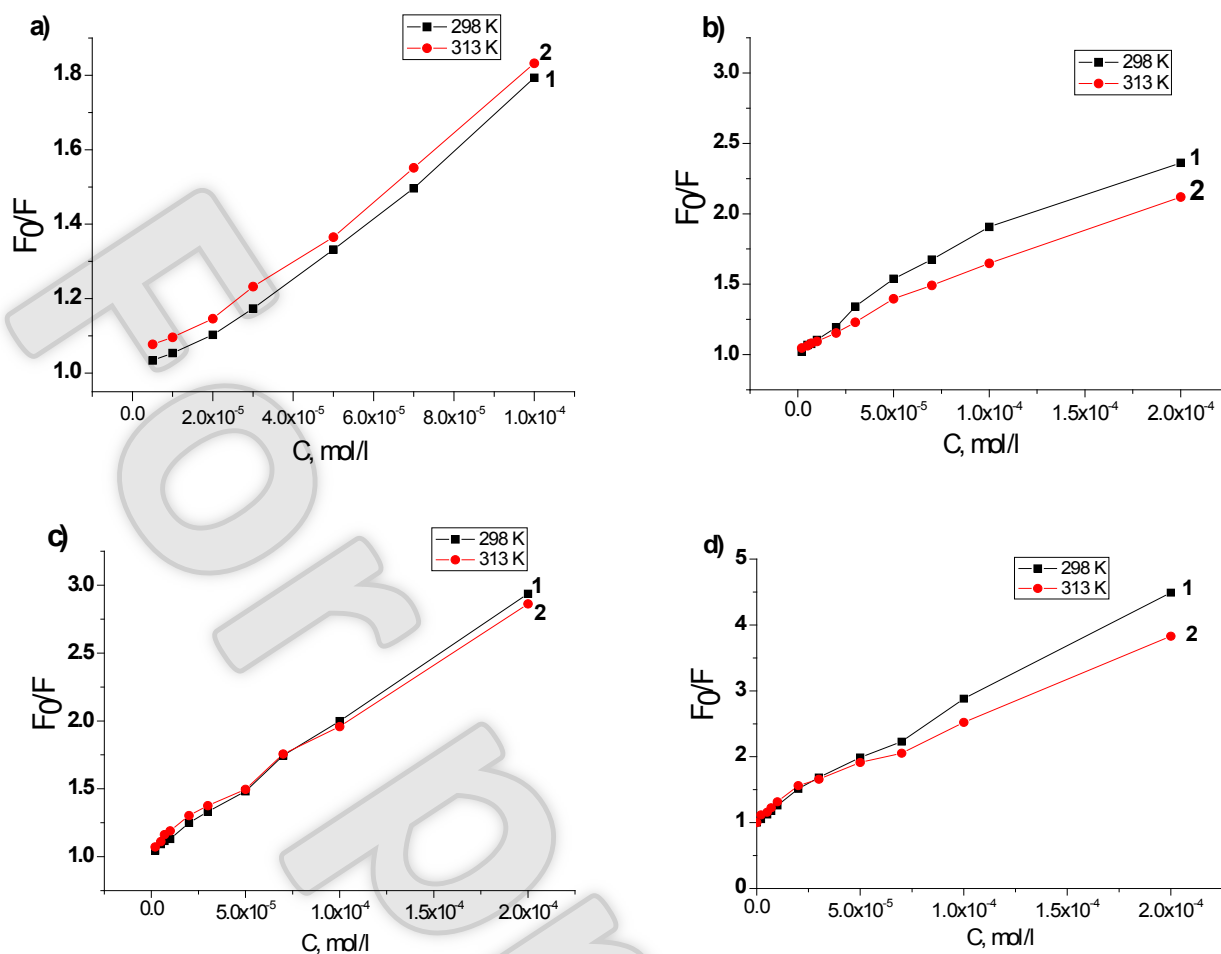


Рисунок 3. Зависимости тушения флуоресценции САЧ от концентраций БД (ГИД (а), ФЕН (b), ПРП (c) и ЛЕВ (d)) при разных температурах в координатах Штерна-Фольмера (рН 7.5, $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм, $\lambda_{\text{эмис}} = 346$ нм, $C_{\text{САЧ}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л).

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} л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$. Очевидно,

что константа скорости тушения k_q для БД-САЧ больше, чем константа диффузии биополимеров 10^{10} л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, которая лимитирует скорость столкновений [30].

Таблица 1. Константы Штерна-Фольмера и константы тушения САЧ при добавлении БД при разных температурах.

Субстанция	T(K)	$K_{sv} \cdot 10^{-4}$ (л·моль $^{-1}$)	R^*	SD	$k_q \times 10^{-12}$ (л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$)
Гидазепам	298	1.16	0.9839	0.15	1.164
	313	1.20	0.9821	0.16	1.195
Феназепам	298	7.00	0.9805	0.09	7.004
	313	5.53	0.9947	0.04	5.534
Пропоксазепам	298	9.51	0.9995	0.021	9.511
	313	8.88	0.9986	0.031	8.876
Левана	298	1.72	0.9983	0.0352	1.72
	313	1.34	0.9963	0.0408	1.34

* коэффициент корреляции; SD - остаточное стандартное отклонение линейной регрессии.

Таким образом, это показывает, что данное тушение флуоресценции САЧ не вызвано динамическим столкновением, а происходит вследствие образования соединения с БД, что можно отнести к статическому тушению (что подтверждается результатами исследования спектров поглощения). Кроме того, линейность графиков Штерна-Фольмера указывает на существование одного типа тушения [31].

Когда малые молекулы независимо связываются с рядом эквивалентных мест макромолекулы, константа связывания (K_A) 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 связывания и количества мест связывания, рассчитанные из уравнения (2), для разных температур представлены в таблице 2.

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.

Константы связывания с белком в ряду бензодиазепинов (гидазепам, феназепам, ПРП, левана) являются величинами одного порядка. Это свидетельствует о том, что основной вклад во взаимодействие с биомacroмолекулой вносит природа 5-фенилбензодиазепинового скелета и о незначительном влиянии групп заместителей на связывание. В случае леваны, константа связывания которой несколько выше в ряду, можно говорить о влиянии свободной карбоксильной группы остатка янтарной кислоты в 3-ем положении

на связывание с белком.

Кроме того, значение n близко к единице, поэтому мы можем заключить, что существует только одно место связывания в макромолекуле САЧ с БД (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 ; R – газовая постоянная.

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

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

Значения ΔH° and ΔS° для аддуктов САЧ–БД представлены в таблице 2.

Существует несколько типов межмолекулярных взаимодействий, вызывающих связывание малых молекул лекарственного средства с белками, таких как ван-дер-ваальсовы, водородные связи, 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 [32]. Согласно литературным данным отрицательные значения ΔH° и ΔS° можно отнести к ван-дер-ваальсовым взаимодействиям в системах САЧ–БД и к образованию водородных связей [33].

Таблица 2. Константы связывания K_A , число мест связывания n и расстояния между акцептором и донором r при разных температурах и термодинамические параметры взаимодействия БД–САЧ ($\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$).

БД	$T(K)$	$K_A \cdot 10^{-3}$ (л·моль ⁻¹)	n	r	ΔH° (кДж·моль ⁻¹)	ΔG° (кДж·моль ⁻¹)	ΔS° (Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹)
Гидазепам	298	3.219	1.15	1.34	-101.63	-25.72	-254.72
	313	0.451	0.93	1.33		-21.90	
Феназепам	298	4.001	0.91	1.33	-104.64	-20.55	-282.18
	313	0.529	0.73	1.37		-16.32	
ПРП	298	1.579	0.80	1.32	-52.78	-18.25	-115.88
	313	0.569	0.70	1.33		-16.51	
Левана	298	7.10	0.89	1.79	-104.37	-21.97	-276.51
	313	0.94	0.70	1.72		-17.82	

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 ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{эм}} - \lambda_{\text{возб}}$).

Конформационные изменения САЧ, вызванные связыванием с БД, оценивали путем измерения синхронных спектров флуоресценции САЧ до и при прибавлении различных количеств БД (рис. 4). В соответствии с литературными данными [34], 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 БД при $\Delta\lambda = 60$ нм показывают батохромный сдвиг (от 3 нм до 6 нм), что свидетельствует о наличии изменений конформации белка около остатка триптофана, а при $\Delta\lambda = 15$ нм показывают практическое отсутствие изменения максимума длины волны, что отражает незначительное изменение окружения остатка тирозина.

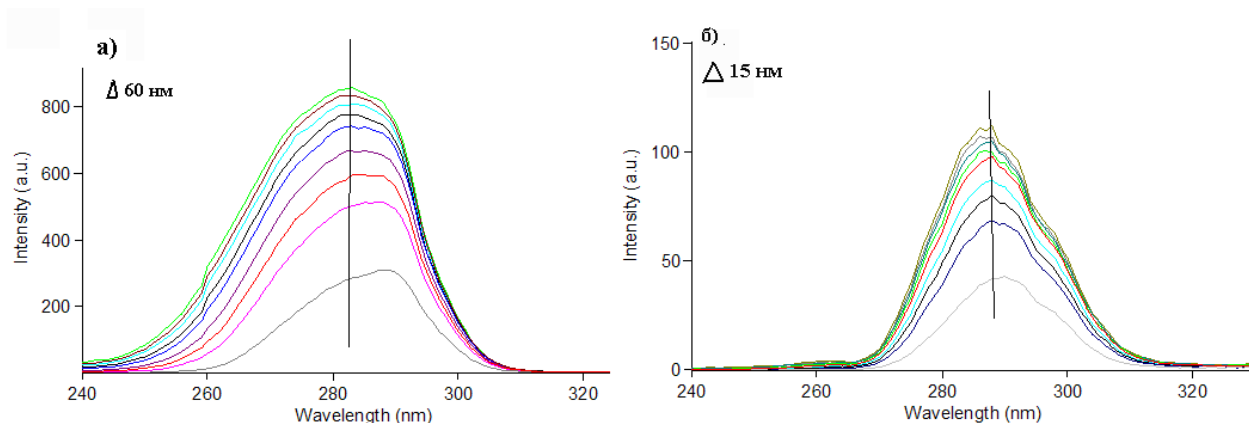


Рисунок 4. Синхронные спектры САЧ при добавлении различных количеств ГИД ($\lambda = 60$ нм (а) и $\lambda = 15$ нм (б); $C_{\text{САЧ}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л; ($C_{\text{ГИД}} \times 10^{-6}$ моль/л), кривые (1-11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7.5).

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 молекулярной системы [35]. 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 [36]. Эффективность передачи энергии между БД и остатком Трп214 САЧ может быть использована для оценки расстояния между ними с использованием FRET. Перекрытие спектров поглощения БД и спектра флуоресценции САЧ приведено на рисунке 5.

Согласно теории безызлучательного резонансного переноса энергии Ферстера [37], эффективность передачи энергии E связана не только с расстоянием (r) между связанной биоактивной молекулой (акцептором) и белковым остатком (донором), но также и с критическим расстоянием переноса энергии (R_0).

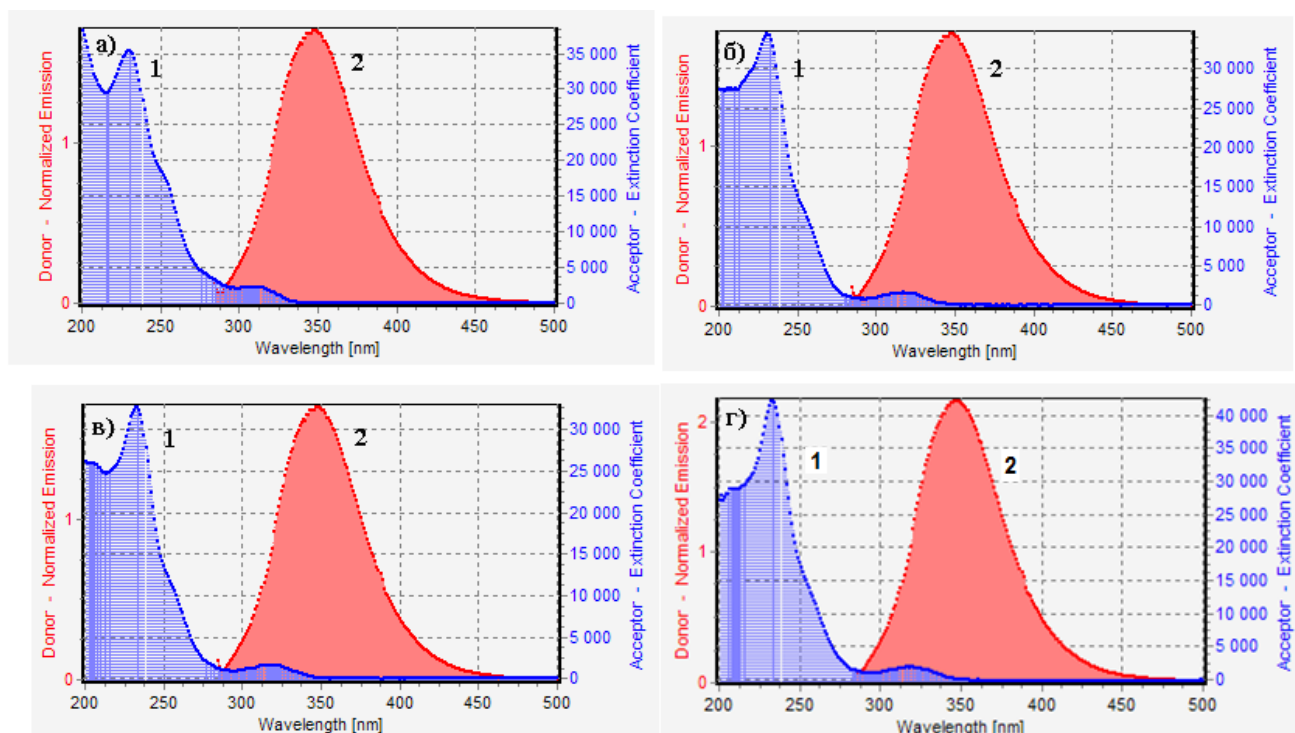


Рисунок 5. Перекрывание спектра поглощения (1) ГИД (а), ФЕН (б), ПРП (в), ЛЕВ (г) и спектра флуоресценции САЧ (2) ($C_{\text{САЧ}}/C_{\text{ГИД}} = 1:1$; 1×10^{-5} моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм).

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 (БД) 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 перекрывания спектра излучения

донора и спектра поглощения акцептора, который определяется по формуле:

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

где: $F(\lambda)$ – нормированная интенсивность флуоресценции донора при длине волны λ ; $\epsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения акцептора при длине волны λ .

В данном случае $K^2 = 2/3$, $n = 1.336$ и $\phi = 0.118$ [38]. Из уравнений (5)–(7) вычислены параметры связывания с белками различных малых молекул (таблица 3).

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

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	1.67×10^{-15}	0.48	2.64	[5]
имидаклоприд	САЧ	3.17×10^{-15}	1.52	2.10	[6]
каптоприл	САЧ	1.09×10^{-18}	2.37	1.05	[7]
мидазолам (БД)	САЧ	1.09×10^{-15}	1.69	2.31	[8]
флавоноид (евпаторин)	БСА	1.79×10^{-14}	1.56	1.64	[9]

Малые молекулы	Белок	J (см ³ ·л·моль ⁻¹)	R_o (нм)	r (нм)	Литература
эрлотиниба гидрохлорид	БСА	3.89×10^{-21}	2.00	2.20	[10]
сангвинарин	БСА	1.29×10^{-14}	2.63	2.38	[11]
карбамазепин	БСА	3.24×10^{-15}	2.11	3.60	[12]
нарингин	БСА	3.24×10^{-15}	2.32	3.25	[13]
3-карбоксифеноксатиин	БСА	1.63×10^{-15}	1.86	1.86	[14]
паклобутразол	САЧ	1.35×10^{-14}	2.58	4.41	[15]
пазуфлоксацин мезилат	БСА	9.93×10^{-15}	2.45	4.04	[16]
бензидин	трипсин	3.92×10^{-15}	2.67	2.97	[17]
неваденсин	лизозим	8.17×10^{-15}	2.41	2.28	[18]
клоназепам (БД)	БСА	7.52×10^{-15}	2.28	3.20	[19]
цефазолин	САЧ	4.48×10^{-15}	2.41	-	[21]
цефтриаксон	САЧ	6.21×10^{-16}	1.40	-	[21]
лорезепам (БД)	БСА	3.57×10^{-16}	4.57	5.54	[23]
оксазепам (БД)	БСА	7.55×10^{-16}	5.18	6.34	[23]
бромазепам (БД)	БСА	6.12×10^{-16}	5.08	6.87	[23]
фосфомицин	БСА	1.87×10^{-14}	2.83	4.99	[24]
сульфаметоксазол	САЧ	1.70×10^{-16}	2.79	3.89	[25]
диклофенак натрия	САЧ	3.70×10^{-14}	3.10	2.98	[26]
фуросемид	САЧ	1.08×10^{-13}	3.70	3.52	[26]
дексаметазон	САЧ	2.25×10^{-13}	4.20	5.30	[26]
гидазепам (БД)	САЧ	2.06×10^{-16}	1.29	1.34	данная работа
феназепам (БД)	САЧ	3.48×10^{-16}	1.40	1.33	данная работа
пропоксазепам (БД)	САЧ	4.51×10^{-16}	1.47	1.32	данная работа
левана (БД)	САЧ	4.20×10^{-16}	1.45	1.79	данная работа

Выводы

Проведено спектроскопическое изучение взаимодействия некоторых бензодиазепинов с сывороточным альбумином человека. Установлены константы и число мест связывания, средние расстояния между донорными и акцепторными молекулами для систем САЧ-БД. Показано, что БД тушат собственную флуоресценцию белка в результате статического взаимодействия в системе САЧ-БД. Определены термодинамические

параметры и установлено, что важную роль в связывании БД с САЧ играют ван-дер-ваальсовы взаимодействия и образование водородных связей.

Такое стандартизированное изучение взаимодействия между САЧ и БД является полезным для фармацевтической промышленности, а также для фармакокинетических и фармакодинамических исследований.

Список литературы

1. Eftink M.R., Ghiron C.A. Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* 1981, 114(2), 199-227. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90474-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90474-7)
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, 5, 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.
4. Kwon S., Carson J.H. Fluorescence Quenching and Dequenching Analysis of RNA Inter-

actions in Vitro and in Vivo. *Anal. Biochem.* 1998, 264, 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, 35, 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, 94, 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, 2, 250-257. <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2011.22030>

8. Shahper N. Khan, Barira Islam , Asad U. Khan. Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effect on structural state of protein. *Int. J Integr. Biol.* 2007, 1 (2), 102-112.
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, 14, 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, 18, 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, 6 (4), 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, 22, 435-438.
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, 1, 141-152. 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, 15, 3905-3919. 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, 67, 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, 128, 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2007.05.008>
17. Zhang H.M., Wangn Y.Q., Zhou Q.H. Fluorimetric study of interaction of benzidine with trypsin. *J. Lumin.* 2010, 130, 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, 189, 114–120. doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.01.017
19. Yan-Yue Lou, Kai-Li Zhou, Dong-Qi Pan, Jia-Le Shen, Jie-Hua Shi. Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA). *J Photochem. Photobiol., B: Biol.* 2017, 167, 158–167. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.029
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, 5, 037-044. <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2015.58.S6>
21. Wang Yi-run, Huang Fang, Liu Ying. Study on the Interaction of Cefazolin and Ceftriaxone with Human Serum Albumin with Multi-Spectroscopic and Docking Methods. *Spectrosc. Spectral Anal.* 2017, 37 (4), 1205 - 1210. DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)04-1205-06
22. Dong C.Y., Xu J., Zhou S.S., Liu Y. Spectroscopic and molecular modeling studies on binding of feroxacin with human serum albumin. *Spectrosc. Spectral Anal.* 2017, 37 (1), 327-332.
23. Machicote R. G., Pacheco M. E., Bruzzzone L. Binding of several benzodiazepines to bovine serum albumin: Fluorescence study. *Spectrochim. Acta Part A.* 2010, 77, 466-472. [doi:10.1016/j.saa.2010.06.020](https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.06.020)
24. Manjunath D. Meti, Sharanappa T Nandibewoor, Shrinivas D Joshi, Uttam A More, Shivamurti A Chimatadar. Multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomycin with bovine serum albumin. *J. Pharm. Anal.* 2015, 5, 249–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.004>
25. Praveen N Naik, Sharanappa T Nandibewoor, Shivamurthi A Chimatadar. Non-covalent binding analysis of sulfamethoxazole to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, UV–vis, FT-IR, voltammetric and molecular modeling. *J. Pharm. Anal.* 2015, 5, 143–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.003>
26. Yasseen Z.J., Ghossain M.E. Studies on Binding of Widely used Drugs with Human Serum Albumin at Different Temperatures and PHs. *J Biomedical Sci.* 2016, 5, 3:19, 1 – 8. [doi:10.4172/2254-609X.100033](https://doi.org/10.4172/2254-609X.100033)
27. 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, 1, 102–112.
28. Valeur B., Brochon J.C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy 6th edn.* Berlin : Springer, 1999, 25–28.
29. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd edn.* New York:Springer, 2006; 954.
30. Sahoo B.K., Ghosh K.S., Dasgupta S. Molecular interactions of isoxazolcurcumin with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Biopolymers.* 2009, 91, 108–119. doi.org/10.1002/bip.21092
31. Silva D., Cortez C.M., Cunha-Bastos J., Louro S.R.W. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicol. Lett.* 2004, 147, 53–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.014>
32. Ross P. D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. *Biochemistry.* 1981, 20, 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>
33. 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, 41, 674-679. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.1989.tb06339.x>

34. Miller J.N. Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* 1979, 16(7), 203-208.

35. Wu P., Brand L. Resonance energy transfer: Methods and applications. *Anal. Biochem.* 1994, 218, 1-13.

36. Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Application*, Wiley Press, New York, 2001, p. 250.

37. Forster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* 1948, 2, 55-75.

38. 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, 45, 609-615. [doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.032](http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.032)