

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім. О.В. БОГАТСЬКОГО**

МАЛЬЦЕВ ГЕОРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ



УДК 543.482.6:665.939.1:577.113:546.663:541.49

**ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДУ АНАЛІЗУ ДЛЯ
ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН
З ДНК ТА ПРОТЕЇНАМИ**

02.00.02 – аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Одеса – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
Антонович Валерій Павлович,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
НАН України, м. Одеса, завідувач
відділу аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
Блажесєвський Микола Євстахійович,
Національний фармацевтичний університет, м. Харків
професор кафедри фізичної та колоїдної хімії

кандидат хімічних наук, доцент
Лівенцова Олена Олегівна,
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса,
доцент кафедри харчової хімії та експертизи

Захист відбудеться “10” жовтня 2018 року на засіданні спеціалізованої вченої ради К. 41.219.01 Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України за адресою: 65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86).

Автореферат розісланий “ ____ ” _____ 2018 року.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради, к.х.н.



О.В. Снурнікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Флуоресцентна спектроскопія є одним з ефективних методів вивчення зв'язування лікарських речовин («малих» молекул) з ДНК та білками, що є важливим для цілей біохімії та медицини. В останні роки в хімічних та біологічних дослідженнях флуоресцентні мітки витісняють радіоізотопні. Таке положення пов'язане з рядом переваг флуоресцентних міток - стабільністю, високою чутливістю визначення, можливістю автоматизації процедур модифікації та детекції, одночасного визначення декількох сполук, мічених різними флуорофорами, а також меншим негативним впливом на навколишнє середовище.

Флуоресцентний метод аналізу нарівні з методом радіоактивного мічення і спектрофотометрією часто використовують для вивчення хімічної структури та фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот. Детальне вивчення нуклеїнових кислот та їх взаємодії з «малими» молекулами дозволяє вирішувати ряд питань медичної хімії, зокрема створення противірусних лікарських препаратів.

Флуоресцентна спектроскопія є одним з методів, що використовується для дослідження взаємодії між лікарськими речовинами та протеїнами, оскільки міжмолекулярні взаємодії змінюють оточення білка-флуорофора. У разі сироваткового альбуміну людини флуорофор є залишком триптофану (Trp214), який є дуже чутливим до його локального оточення і може бути використаний для спостереження змін спектрів флуоресцентної емісії через конформаційні зміни білка при зв'язуванні з субстратами. Вивчення взаємодії між білками і молекулами ліків може надати інформацію щодо фармакологічної дії, біоперетворення та біорозподілу лікарських засобів.

Зв'язок роботи з науковими темами, програмами, планами. Дисертаційну роботу виконано у відділі аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України у відповідності з відомчими темами «Біоаналітичне застосування люмінесцентних зондів на основі нових комплексних сполук лантанідів» (2013 – 2014 рр., номер держ. реєстрації 0113U000198); «Розробка та валідація методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання» (2017 – 2018 рр., номер держ. реєстрації 0217U000101).

Мета і завдання дослідження. Розширення можливостей люмінесцентного методу аналізу для визначення констант зв'язування з ДНК сполук ряду алкіламіноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренону (АФ) з використанням люмінесцентного зонду на основі нової комплексної сполуки іонів тербію та вивчення зв'язування деяких лікарських речовин (ЛР) з сироватковим альбуміном людини (САЛ).

Для досягнення поставленої мети необхідно:

- 1) встановити спектральні характеристики похідних 2-оксо-4-гідрокси-хінолін-3-карбонової кислоти і вивчити люмінесцентні властивості їх подвійних комплексів з іонами Tb(III);
- 2) визначити константи зв'язування сполук ряду АФ з ДНК із застосуванням нового лантанідного зонду і оцінити вплив структурних особливостей АФ на їх афінитет до ДНК;
- 3) встановити наявність взаємодії деяких лікарських речовин з САЛ і визначити параметри зв'язування: константи, кількість місць зв'язування та відстані між донором (САЛ) і акцептром (ЛР);
- 4) розробити новий підхід для визначення параметрів зв'язування САЛ з молекулами ЛР за гасінням їх власної флуоресценції (для ЛР, у яких відбувається накладення їхніх спектрів емісії на власну флуоресценцію протеїну);
- 5) розробити високочутливі методики визначення ДНК у модельних розчинах та ЛР у змивах з поверхонь фармацевтичного обладнання.

Об'єкт дослідження – комплексні сполуки Tb(III) з похідними амідів оксохінолінкарбонової кислоти, лікарські речовини, ДНК, сироватковий альбумін людини.

Предмет дослідження – визначення параметрів зв'язування деяких ЛР з біомакромолекулами (ДНК, САЛ) за гасінням люмінесценції.

Методи дослідження – спектрофотометрія, люмінесцентна спектроскопія.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше запропоновано новий люмінесцентний зонд – комплекс тербію (III) з похідним 2-оксо-4-гідроксохінолін-3-карбонової кислоти замість коштовного і токсичного етидію броміду для вивчення інтеркаляції ДНК ряду аміноалкоксифлуоренонів. Показано можливості та переваги нового люмінесцентного зонда.

Вперше для ряду бенздіазепінів і противірусних препаратів люмінесцентним методом встановлено характер їх взаємодії з САЛ, визначено число місць і константи зв'язування, відстані між донором (САЛ) і акцептором (ЛР).

Запропоновано новий спосіб люмінесцентного визначення параметрів взаємодії САЛ з деякими лікарськими препаратами, для яких характерним є перекривання їхніх спектрів флуоресценції зі спектрами емісії САЛ.

Практичне значення одержаних результатів. Із застосуванням флуоресцентного методу проведено вивчення взаємодії ЛР (тилорону, гідазепаму, феназепаму, левана, пропоксазепаму, діазепаму) із САЛ. Відповідні звіти впроваджено у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» (додаток 1).

Розроблено експресну та високочутливу методику люмінесцентного визначення пропоксазепаму в змивах з технологічного обладнання. Методику впроваджено у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» (додаток 1).

Особистий внесок здобувача. Аналіз літературних даних, основний обсяг експериментальних досліджень та обробку одержаних результатів виконано безпосередньо автором. Встановлення мети та завдань дослідження, аналіз отриманих результатів, а також формулювання загальних висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися на конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції (Київ, 18-21 жовтня, 2017), 17th Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Bruges-Belgium, 10-13 September, 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квітня, 2018), Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, 23-25 квітня, 2018), XIII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Харків, 2-4 травня, 2018), 8 th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BVCAC) (Istanbul-Turkey, 9-11 May, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у фахових періодичних наукових виданнях, тези 6 доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій. Отримано 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку цитованої літератури, що нараховує 179 найменувань, містить 64 рисунків, 18 таблиць та 2 додатки. Загальний обсяг дисертації складає 156 сторінки машинописного тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання дослідження, зазначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

У першому розділі систематизовані та проаналізовані літературні дані про застосування флуоресцентного методу для визначення констант зв'язування ЛР з біомакромолекулами. Показано можливості застосування цього методу, а також низку обмежень (зокрема неможливість визначати параметри зв'язування по гасінню флуоресценції білка, якщо накладається власна люмінесценція ЛР), тому вдосконалення методу для цих цілей є актуальним. На основі огляду літератури сформульовано мету та завдання дисертаційного дослідження.

У другому розділі описано вихідні речовини, охарактеризовано використане обладнання та апаратура. В роботі використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а.

Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метра Lab 850 «Schott Instruments GmbH» (Німеччина) із скляним електродом.

Термостатування проб (для вимірювань при 40°C) проводили на водяній бані WNB 7-45 (Memmert GmbH, Німеччина).

Спектри люмінесценції та збудження реєстрували за допомогою спектрофлуориметра Cary Eclipse «Varian» (Австралія) з подвійними джерелами світла (ксенонова лампа 150-W суцільного спектру та імпульсна лампа). Всі вимірювання проводили при кімнатній температурі (21–23 °C). Технічні характеристики Cary Eclipse "Varian": ширина імпульсу 2 мкс; оптика Шварцшильда; оптичний діапазон збудження: 200–900 нм; оптичний діапазон емісії: 200–900 нм; спектральна ширина щілин: 1,5; 2,5; 5; 10 та 20 нм; максимальна швидкість сканування: 24000 нм/хв.

Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC «Shimadzu» (Японія), спектральний діапазон вимірювань від 190 нм до 900 нм, точність: $\pm 0,003$ А (поглинання).

У третьому розділі вивчено спектральні характеристики деяких аміноалкоксифлуоренонів (АФ) – нових потенційних противірусних препаратів, аналогів тилорону – у водних розчинах, показано, що спектри поглинання характеризуються наявністю смуг в ультрафіолетовій і видимій областях з високими молярними коефіцієнтами поглинання. Похідні АФ (таблиця 3) синтезували взаємодією 2,7-біс-(ω -іодалкокси) флуоренонів з відповідними вторинними амінами.

У якості комплексоутворювачів використано реагенти – похідні 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти L₁₋₈, структурні формули яких наведено у таблиці 1.

Спектри поглинання лігандів (L₁₋₈) у водних розчинах характеризуються наявністю двох смуг в ультрафіолетовій області спектра (таблиця 1) з високими молярними коефіцієнтами поглинання (ϵ).

Енергії триплетних рівнів вивчених лігандів (таблиця 1), які розраховані зі спектрів фосфоресценції їх комплексів з іоном гадолінію (III) при 77К (20580-20930 см⁻¹), вище енергії рівнів збудженого стану іонів Tb(III) (20500 см⁻¹).

Кінетика гасіння люмінесценції для смуг з максимумом при 545 нм для іонів Tb(III) (⁵D₄) є експоненційною і може бути охарактеризованою часом життя збудженого стану τ , значення яких для всіх лігандів наведено у таблиці 1.

Наявність смуг поглинання в УФ області спектру з високими молярними коефіцієнтами поглинання, а також величини енергій триплетних рівнів лігандів дозволяють припустити, що в комплексах іонів лантанідів із зазначеними лігандами може здійснюватися ефективний перенос енергії від органічної частини молекули до іону лантаніду.

Оскільки взаємодію іонів Tb(III) з лігандами L₁₋₈ раніше не було описано в літературі, нами вивчено умови їх комплексоутворення і деякі спектрально-люмінесцентні властивості комплексів, що утворюються.

відповідністю з їх спектрами поглинання (таблиця 1). Для прикладу представлені спектри збудження комплексів Tb(III) з деякими вивченими лігандами (рисунок 1).

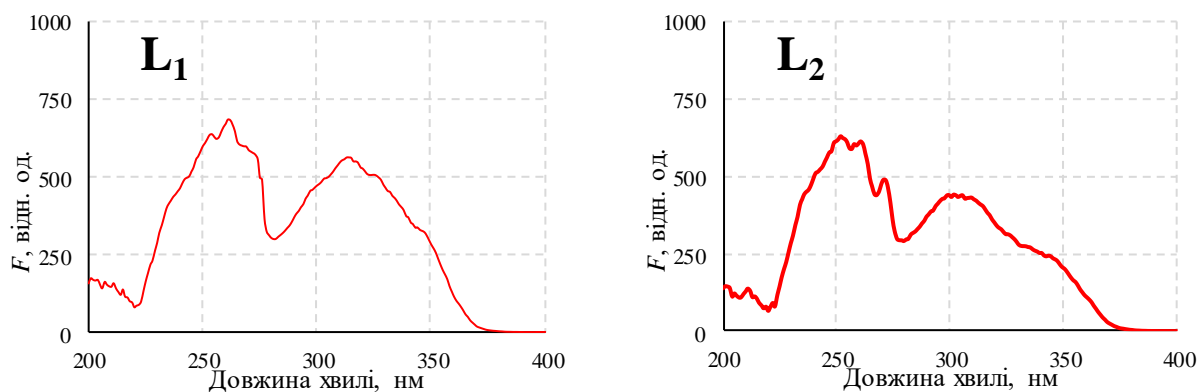


Рисунок 1. Спектри збудження комплексів Tb(III) з L_{1,2} (C_{Tb³⁺} = 1·10⁻⁵ моль/л; C_L = 5·10⁻⁵ моль/л)

Встановлено, що для досягнення максимальної інтенсивності люмінесценції необхідні 5–20-кратні надлишки реагентів по відношенню до іонів лантанідів. За люмінесцентними даними методом обмеженого логарифмування встановлено, що при нестачі ліганда або при еквімолярному співвідношенні Tb:L₁₋₈ утворюються комплекси Tb:L₁₋₈ = 1:1, а в надлишку лігандів утворюються комплекси зі співвідношенням компонентів Tb:L₁₋₈ = 1:2 (рисунок 2).

Комплексоутворення похідних хінолонкарбонової кислоти з іонами Tb(III) відбувається в широкому інтервалі значень рН - від 3.0 до 11.0 з максимумами люмінесценції при рН 7.5 (рисунок 3). При більш низьких значеннях рН ступінь утворення комплексів є малим, а в лужних розчинах (при рН>9) хелатоутворенню перешкоджає гідроліз іона лантаніда.

Встановлено, що інтенсивність люмінесценції досліджуваних комплексів залишається постійною протягом 30 хвилин, що свідчить про їхню фотостабільність.

Комплексні сполуки іонів Tb(III) з похідними 2-оксо-4-гідроксхінолін-3 карбонової кислоти відповідають основним вимогам до люмінесцентних зондів в біоаналізі. Отже, уявляється можливим використовувати вивчені комплекси як люмінесцентні зонди для цілей біоаналітичної хімії.

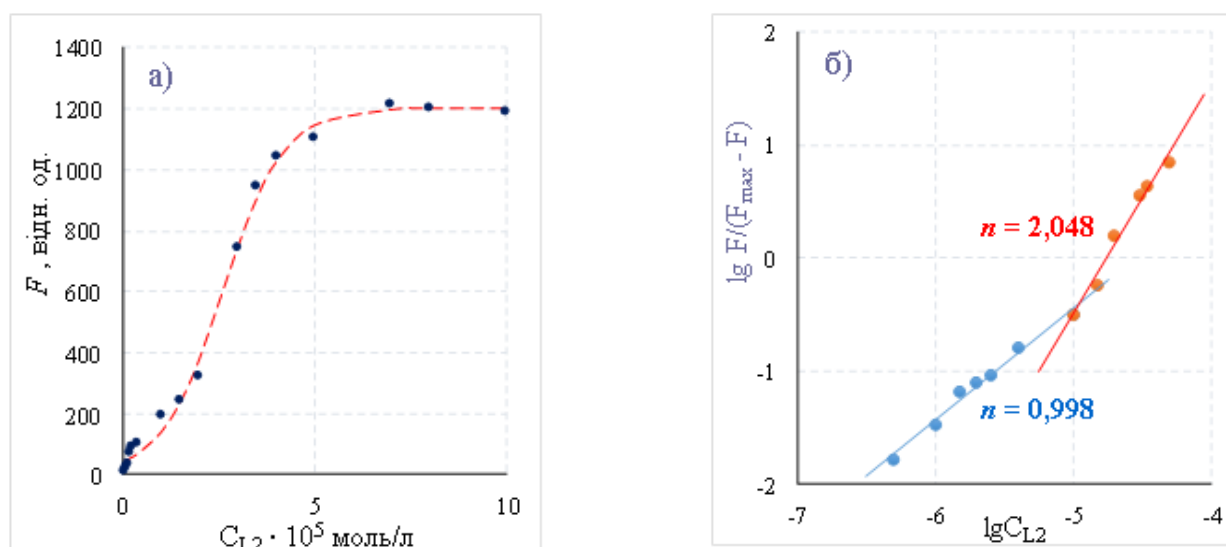


Рисунок 2. Залежність F від концентрації L₂ (а); визначення співвідношення компонентів у комплексі Tb-L₂ методом обмеженого логарифмування (б) (C_{Tb} = 1·10⁻⁵ моль/л)

З метою виявлення придатності застосування нових комплексних сполук тербію з L₁₋₈ для визначення ДНК і вивчення афінитету до ДНК деяких противірусних препаратів представляло інтерес вивчення їх люмінесцентних властивостей в присутності ДНК. Отримані дані представлені в таблиці 2.

Встановлено, що при додаванні розчину ДНК до комплексів Tb(III)-L_{1,3,4,6} відбувається незначне збільшення інтенсивності люмінесценції в порівнянні з інтенсивністю їх подвійних комплексів, і в разі комплексів Tb(III)-L_{2,5,7,8} відбувається збільшення інтенсивності люмінесценції (в 10,8; 6,7; 8,4 та 9,1 раза відповідно). В подальшій роботі вивчали взаємодію в системі Tb(III)-L₂-ДНК, для якої спостерігається максимальне збільшення інтенсивності люмінесценції в присутності ДНК.

Вивчено вплив концентрацій іонів тербію (III) і реагентів на F потрійної системи Tb(III)-L-ДНК. Встановлено, що оптимальними є рівні концентрації тербію і реагентів (1·10⁻⁶ моль/л), в таких концентраційних умовах утворюється комплекс Tb(III)-L зі співвідношенням компонентів 1:1.

Таблиця 2

Спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів з іонами тербію у відсутності та присутності ДНК (C_{ДНК}=1 мкг/мл; C_{Tb}=C_L=1·10⁻⁶ моль/л)

№ реагенту	Tb(III) – L		Tb(III) – L – ДНК		k= F* / F
	F	τ, мкс	F*	τ, мкс	
1	348	–	783	–	2,3
2	45	468	486	781	10,8
3	442	–	1216	–	2,8
4	243	–	770	–	3,2
5	136	526	915	776	6,7
6	320	–	1107	–	3,5
7	98	460	827	771	8,4
8	86	425	781	670	9,1

Для застосування комплексу Tb(III)-L₂ як зонду при вивченні афінитету до ДНК необхідно розрахувати його константу зв'язування з ДНК з даних методу конкуренції з етидію бромідом (ЕБ). Досліджуваний зонд Tb(III)-L₂ в експериментах з витіснення інтеркальованого етидію броміду призводить до практично повного припинення його флуоресценції, тобто до витіснення ЕБ з комплексу з ДНК.

Виходячи з даних люмінесцентного титрування, розраховано константу зв'язування ДНК з комплексом Tb(III)-L₂ (lgK_{Tb-L} = 6.42±0.03). Отримана константа зв'язування типова для інтеркаляторів.

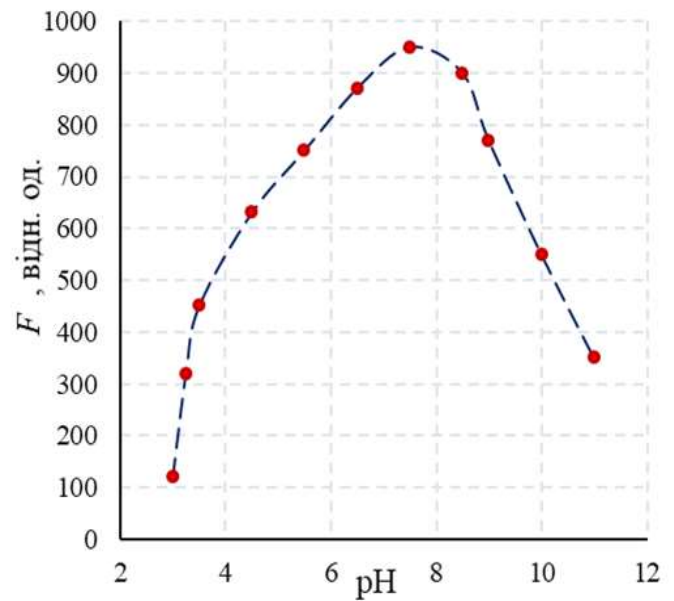


Рисунок 3. Залежність F комплексу Tb-L₂ від кислотності середовища (C_{Tb}= 1·10⁻⁶ моль/л; C_{L2} = 5·10⁻⁶ моль/л)

Методом конкуренції з новим зондом (комплексом Tb(III)-L₂) показано, що всі синтезовані сполуки є інтеркаляторами ДНК, визначено логарифми констант асоціації синтезованих АФ з ДНК. Наприклад, залежність витіснення Tb(III)-L₂ від lgC_{R6}, з якої обчислювали значення lgC₅₀, представлено на рисунку 4.

Розраховані значення логарифмів констант зв'язування для вивчених АФ наведено в таблиці 3.

На підставі отриманих даних проведено аналіз впливу варіації кількості метиленових ланок у ланцюзі лінкеру та природи термінальної групи на варіацію константи зв'язування досліджуваних сполук з нуклеїновими кислотами за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA). Результати аналізу впливу структури алкіламіноалкоксипохідних

2,7-діоксифлуоренону-9 на афінитет до ДНК наведено у таблиці 4. Розраховані дисперсійні відносини ($F_{\text{факт}}$) для фактору А (кількість метиленових ланок в бічних ланцюгах) і фактору В (природа термінальної групи) набагато перевершують відповідні квантильні значення F -розподілу, які визначені для 99%-го довірчого рівня.

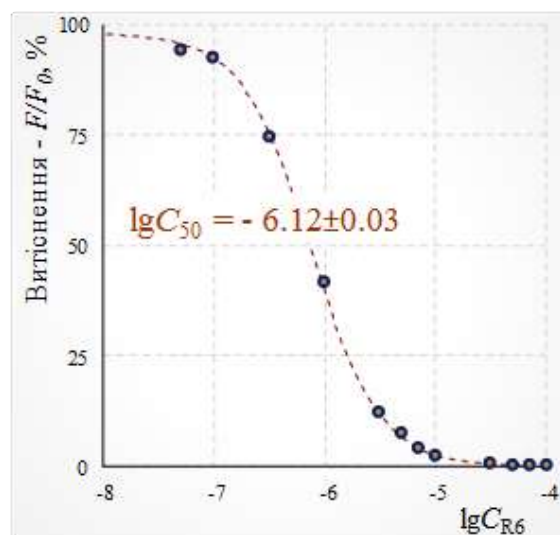
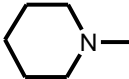
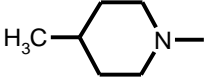
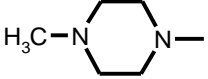
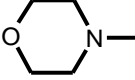
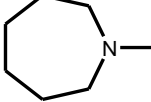


Рисунок 4. Крива витіснення реагентом R₆ зонду Tb(III)-L₂ з його сполуки з ДНК

Таблиця 3

Логарифми констант зв'язування алкіламіноалкоксифлуоренонів з ДНК, розраховані по гасінню зонду Tb(III)-L₂

Варіація фактору В (термінальна група)		Варіація фактору А (кількість метиленових ланок в бічних ланцюгах)			Середнє значення (внесок фактору В) \bar{X}_i^B
		А ₁ етокси	А ₂ пропокси	А ₃ бутокси	
	1	2	3	4	5
B ₁		6,58 (R1)	6,62 (R2)	6,75 (R3)	6,65
B ₂		6,41 (R4)	6,58 (R5)	6,21 (R6)	6,40
B ₃		6,87 (R7)	6,99 (R8)	7,15 (R9)	7,00
B ₄		6,44 (R10)	6,64 (R11)	6,95 (R12)	6,68
B ₅		6,49 (R13)	6,65 (R14)	7,01 (R15)	6,72

1	2	3	4	5	1
B ₆		6,54 (R16)	6,67 (R17)	6,82 (R18)	6,68
B ₇		6,51 (R19)	6,80 (R20)	6,98 (R21)	6,76
B ₈		6,47 (R22)	6,53 (R23)	6,61 (R24)	6,54
B ₉		6,22 (R25)	6,52 (R26)	6,87 (R27)	6,54
B ₁₀		6,50 (R28)	6,63 (R29)	6,93 (R30)	6,69
Середнє значення (внесок фактору А), \bar{x}_i^A		6,50	6,66	6,83	6,67

Таблиця 4

Результати проведення дисперсійного аналізу впливу структури АФ на афінитет до ДНК

Джерело варіації	Сума квадратів відхилень	Ступені свободи	Оцінка дисперсії	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{крит.}}$ для P = 99%
Фактор А	0,645	2	0,323	52,6	6,01
Фактор В	0,470	9	0,052	8,5	3,60
Залишкова	0,110	18	0,006		
Загальна	1,226	29			

Оцінка внесків варіацій факторів, що впливають на зміну досліджуваної ознаки (зв'язування з ДНК), представлено на рисунку 5.

Таким чином, встановлено, що зміна кількості метиленових ланок у ланцюзі лінкера в бічному фрагменті призводить до достовірної зміни афінитету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК.

При додаванні розчину ДНК до комплексу Tb(III)-L₂ відбувається різке збільшення інтенсивності люмінесценції.

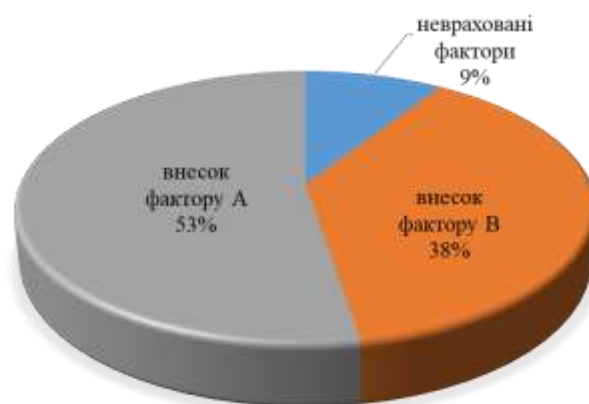


Рисунок 5. Діаграма внесків факторів, що впливають на зміну досліджуваної ознаки (зв'язування з ДНК)

Як видно з рисунку 6, лінійна залежність інтенсивності люмінесценції комплексу Tb(III)-L₂ від концентрації ДНК спостерігається в інтервалі 0.1–1.0 мкг/мл. Межа виявлення ДНК становить 30 нг/мл. Результати визначення ДНК в модельних розчинах представлено в таблиці 5.

Таким чином, вивчений люмінесцентний зонд Tb(III)-L₂ також може бути використаний для кількісного визначення ДНК.

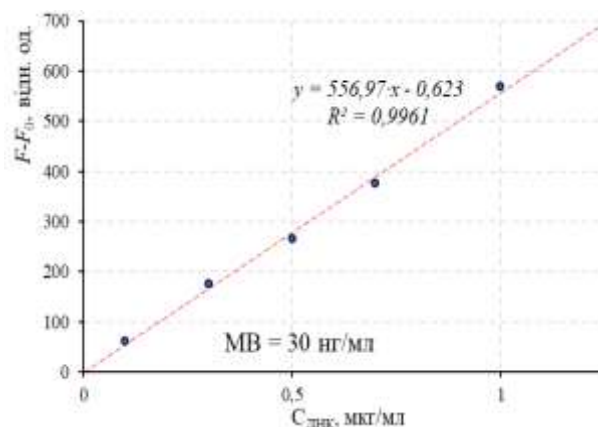


Рисунок 6. Градувальний графік для визначення ДНК ($C_{Tb} = C_{L2} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{ДНК} = 0.1 - 1.0$ мкг/мл)

Таблиця 5

Результати визначення ДНК методом «введено-знайдено» в модельних розчинах та метрологічні характеристики методики ($n = 3, P = 0.95$)

Сторонні речовини	Введено, мкг/мл	Знайдено, мкг/мл	S_T	Відкриваємість, %	$\delta, \%$
САЛ, Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , глюкоза, L-аланін	0.100	0.101±0.013	0.051	101.0	1.0
	0.200	0.197±0.021	0.042	98.5	1.5
	0.300	0.302±0.039	0.052	100.7	0.7

$C_{Me^{n+}}$, глюкоза = $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C_{L-аланін} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л

У четвертому розділі проведено спектроскопічне вивчення взаємодії деяких ЛР з сироватковим альбуміном людини. Взаємодію ЛР з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка (гасіння) при додаванні ЛР. На рисунку 7 наведено спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей деяких бенздіазепінів (БД) –

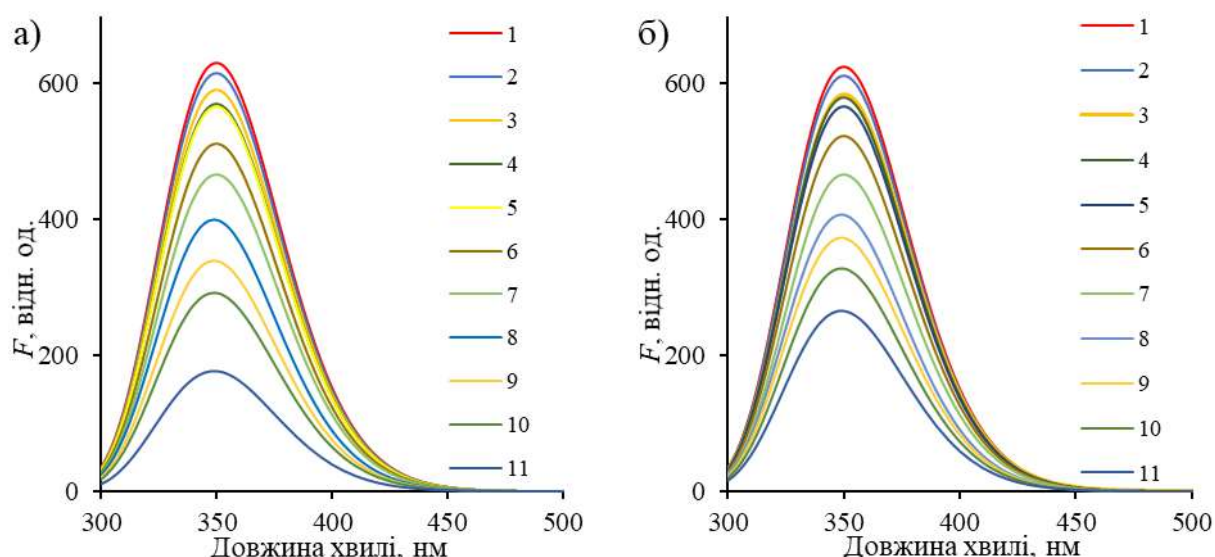


Рисунок 7. Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей БД: ГІД (а), ФЕН (б), ($C_{БД} \cdot 10^{-6}$ моль/л, криві (1-11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5, $\lambda_{збуд} = 280$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К)

гідазепаму (ГІД) та феназепаму (ФЕН). Емісія САЛ характеризується широкою смугою з довжини хвилі 346 нм. При збільшенні концентрації ЛР інтенсивність флуоресценції САЛ помітно зменшується.

Аналіз зміни емісії САЛ при різних концентраціях ЛР проводився за рівнянням Штерна–Фольмера.

На рисунку 8 наведено графіки залежності F_0/F від концентрації деяких ЛР при різних температурах, з яких встановлено константи гасіння Штерна–Фольмера (K_{SV}) (таблиця 6). Процес гасіння може бути викликаний процесом зіткнення або утворенням аддукту між флуорофором і гасником. Величини констант швидкості гасіння мають розмірність 10^{12} л·моль⁻¹·с⁻¹ – більше, ніж константа дифузії біополімерів 10^{10} л·моль⁻¹·с⁻¹, яка лімітує швидкість зіткнень. Це вказує на те, що дане гасіння флуоресценції САЛ можна віднести до статичного гасіння.

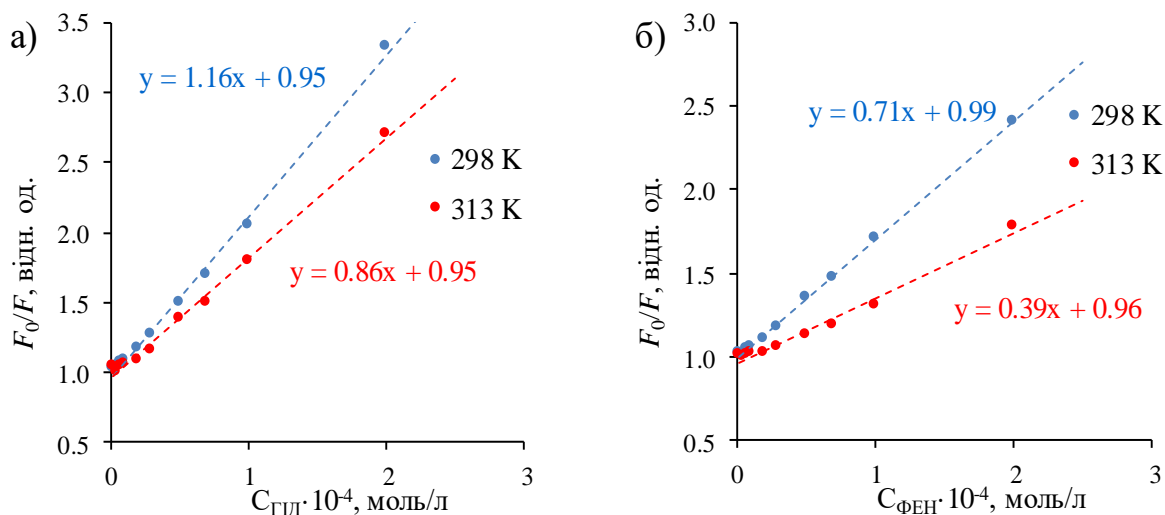


Рисунок 8. Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрації БД (ГІД (а), ФЕН (б)) при різних температурах в координатах Штерна–Фольмера (рН 7,5, $\lambda_{збуд} = 280$ нм, $\lambda_{еміс} = 346$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

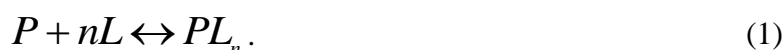
Таблиця 6

Константи Штерна–Фольмера (K_{SV}), константи гасіння САЛ (k_q) при додаванні ЛР (298К) та параметри взаємодії між донором і акцептором за FRET

ЛР	$K_{SV} \cdot 10^4$ (л·моль ⁻¹)	$k_q \cdot 10^{12}$ (л·моль ⁻¹ с ⁻¹)	J (см ³ л моль ⁻¹)	R_0 , (нм)	r , (нм)
Гідазепам	1.16	1.16	$2.06 \cdot 10^{-16}$	1.29	1.34
Феназепам	0.70	0.70	$3.48 \cdot 10^{-16}$	1.40	1.33
Пропоксазепам	0.95	0.95	$4.51 \cdot 10^{-16}$	1.47	1.32
Левана	1.72	1.72	$4.20 \cdot 10^{-16}$	1.45	1.79
Діазепам	0.61	0.61	$7.90 \cdot 10^{-16}$	1.61	1.76
Тилорон	3.23	3.23	$7.88 \cdot 10^{-16}$	1.67	1.63
Мориноксин	26.8	26.8	$2.35 \cdot 10^{-14}$	2.83	2.37
Долутегравір натрію	1.72	1.72	$3.16 \cdot 10^{-15}$	2.03	2.14
Софосбувір	2.07	2.07	$3.51 \cdot 10^{-16}$	1.41	1.04
Індометацин	6.30	6.30	$5.41 \cdot 10^{-16}$	1.51	1.25
Даклатасвиру дигідрохлорид*	5.71	5.71	$1.04 \cdot 10^{-15}$	1.69	1.42
Індометацин*	4.58	4.58	$9.98 \cdot 10^{-16}$	1.65	1.44

* результати, отримані з гасіння власної флуоресценції ЛР.

Гасіння флуоресценції САЛ у присутності ЛР відбувається за статичним механізмом, тобто за рахунок оборотного зв'язування протеїну (P) з n молекулами ліганду (L) в основному стані:



Процес зв'язування характеризується константою рівноваги K , яка визначається через рівноважні концентрації за законом діючих мас, коли «малі» молекули незалежно зв'язуються з рядом еквівалентних місць макромолекули. У цьому випадку логарифмічна лінеаризація закону діючих мас призводить до наступного лінійного виразу:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \cdot \lg \left([L]_t - n \cdot [P]_t \cdot \frac{F_0 - F}{F_0} \right), \quad (2)$$

де: F_0 – інтенсивність флуоресценції у відсутності гасника;
 F – інтенсивність флуоресценції у присутності гасника.

Значення зміни ентальпії (ΔH°) і зміни ентропії (ΔS°) отримано з рівняння Вант-Гоффа (3), вважаючи, що ΔH° не змінюється значно в експериментальному діапазоні температур:

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

де: K_A – константа зв'язування при певній температурі T ;
 R – газова стала ($R = 8.314 \text{ Дж} \cdot \text{К}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Величину зміни вільної енергії ΔG° , необхідної для зв'язування, оцінювали за рівнянням Гіббса:

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

Таблиця 7

Константи (K_A) зв'язування і термодинамічні параметри взаємодії деяких ЛР з САЛ

Назва препарату	$T, \text{ К}$	$K_A \cdot 10^{-3} \text{ л} \cdot \text{М}^{-1}$	n	ΔG° кДж·М ⁻¹	ΔH° кДж·М ⁻¹	ΔS° Дж·М ⁻¹ ·К ⁻¹
Діазепам	298	12.0	1.07	-0.46	-21.24	-69.74
	313	8.0	1.05	0.59		
Гідазепам	298	32.2	1.15	-25.72	-101.63	-254.72
	313	4.51	0.93	-21.90		
Левана	298	7.10	0.89	-21.97	-104.37	-276.51
	313	0.94	0.70	-17.82		
Пропоксазепам	298	1.58	0.80	-18.25	-52.78	-115.88
	313	0.57	0.70	-16.51		
Феназепам	298	4.00	0.91	-20.55	-104.64	-282.18
	313	0.53	0.73	-16.32		
Тилорон	298	71.9	1.08	-27.71	-33.64	-19.91
	313	37.5	1.05	-27.41		
Мориноксин	298	255.2	1.20	-36.10	-150.39	-383.53
	313	16.9	1.01	-30.35		
Долутегравір натрію	298	9.82	1.11	-5.66	-65.96	-202.33
	313	2.74	0.99	-2.63		
Софосбувір	298	5.35	1.11	-27.0	-215.7	-633.4
	313	1.84	1.05	-19.4		
Індометацин	298	89.1	1.02	-	-	-
Даклатасвіру дигідрохлорид*	298	81.3	1.00	-28.01	-53.01	-83.88
	313	29.2	0.93	-26.75		
Індометацин*	298	60.3	1.00	-27.27	-43.35	-53.97
	313	26.1	0.98	-26.46		

* – результати отримані за гасінням власної флуоресценції ЛР.

Значення констант (K_A) і кількості місць зв'язування (n) для різних температур, а також значення ΔH° , ΔS° і ΔG° для аддуктів САЛ-ЛР представлено в таблиці 7. Встановлено, що важливу роль у зв'язуванні відіграють Ван-дер-Ваальсові взаємодії і утворення водневих зв'язків.

Таке стандартизоване вивчення взаємодії між САЛ і ЛР є корисним для фармацевтичної промисловості і клінічної медицини.

Проведено вивчення конформаційних змін САЛ, викликаних зв'язуванням з ЛР шляхом вимірювання синхронних спектрів флуоресценції (рисунок 9), які були отримані при $\Delta\lambda = 15$ нм і $\Delta\lambda = 60$ нм для підтвердження взаємодії із залишками тирозину і триптофану відповідно.

Синхронні спектри флуоресценції практично всіх ЛР при $\Delta\lambda = 60$ нм показують батохромний зсув (від 3 нм до 10 нм), що свідчить про наявність змін конформації білка поблизу залишку триптофану, а при $\Delta\lambda = 15$ нм вони показують практичну відсутність зміни максимуму довжини хвилі, що свідчить про незначну зміну оточення залишку тирозину.

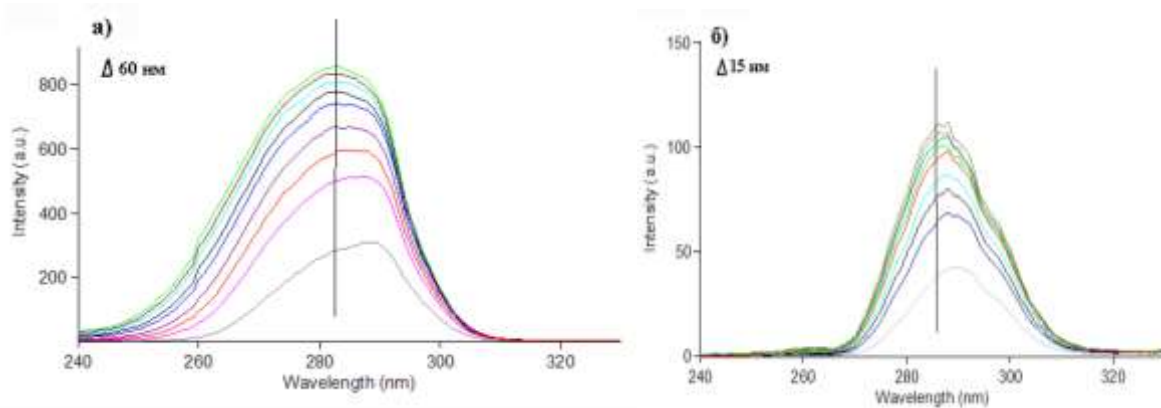


Рисунок 9. Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ГІД ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{ГІД} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1-11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

Згідно з теорією безвипромінювального резонансного переносу енергії Фьорстера (FRET), ефективність передачі енергії E пов'язана не тільки з відстанню (r) між біоактивною молекулою (акцептором) і білковим залишком (донором), але також і з критичною відстанню перенесення енергії (R_0). Ефективність перенесення енергії між ЛР і залишком Трп214 САЛ може бути використаною для оцінки відстані між ними із застосуванням FRET. Значення r для різних температур наведено у таблиці 6. На рисунку 10 наведено перекривання спектрів поглинання ГІД (ФЕН) та спектру флуоресценції САЛ.

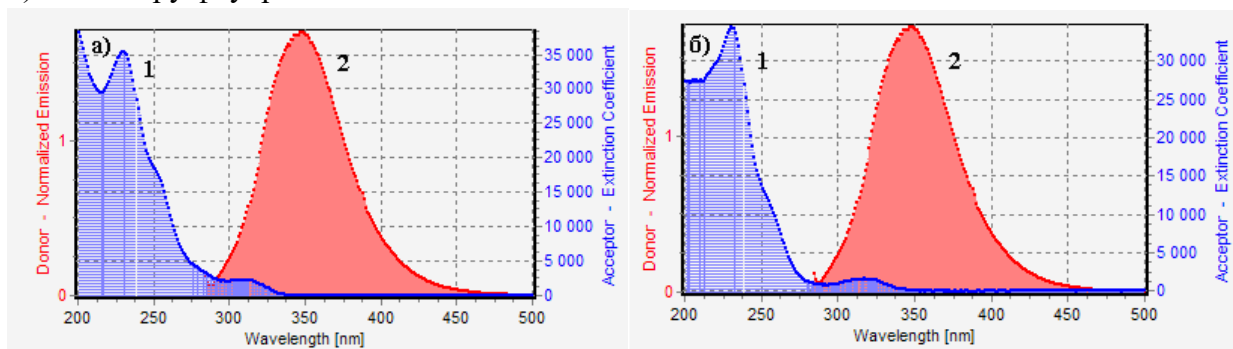


Рисунок 10. Перекривання спектру поглинання (1) ГІД (а), ФЕН (б) і спектру флуоресценції САЛ (2) ($C_{САЛ}/C_{ЛР} = 1$; $1,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{збуд} = 280$ нм)

Для комплексу САЛ–діазепам відомі дані щодо його будови, яку було визначено рентгеноструктурним дослідженням: середня відстань (r) між залишком Трп214 і діазепаму становить 1,91 нм. Цей результат задовільно узгоджується з величиною відстані між донором і акцептором в цій системі, визначеною за FRET флуоресцентним методом аналізу – 1,76 нм (таблиця 6). Різниця в значеннях r становить 0,15 нм, що відповідає роздільній здатності рентгеноструктурного методу (0,295 нм). Можливість флуоресцентного методу аналізу визначити наявність взаємодії ЛР-альбумін, а також майже ідентична оцінка відстані між лікарським засобом

і протеїном, що визначається цим методом і прямим рентгенівським виміром, свідчать на користь флуоресцентної спектроскопії як альтернативи рентгенівської кристалографії для аналізу взаємодії ЛР–протеїн, оскільки рентгенівські дослідження набагато дорожчі, вимагають багато часу і мають обмеження з кристалізації білка.

Вперше показано, що у разі ЛР, для яких відбувається накладення їх спектру емісії на власну флуоресценцію білка, показано можливість визначення констант зв'язування САЛ з молекулами лікарських речовин за гасінням їх власної флуоресценції.

Якщо відбувається перекривання спектрів флуоресценції ЛР зі спектром емісії САЛ, тобто флуорофором є ліганд, а гасником – протеїн, тоді відносна зміна інтенсивності флуоресценції F буде пропорційна зміні концентрації ліганду (ЛР):

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

В цьому випадку логарифмічна лінеаризація закону діючих мас призводить до наступного лінійного виразу:

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

Взаємодію індометацину (ІНД) з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка при додаванні ІНД (рисунок 11 (а)). При збільшенні концентрації ІНД смуга флуоресценції САЛ перекривається спектром власної флуоресценції ІНД. Однак в області близько 346 нм спостерігається невелика область спектру, де інтенсивність флуоресценції САЛ помітно зменшується.

У другому випадку (рисунок 11 (б)) спостерігається монотонне падіння інтенсивності власної флуоресценції ІНД при додаванні САЛ практично на всій області спектру.

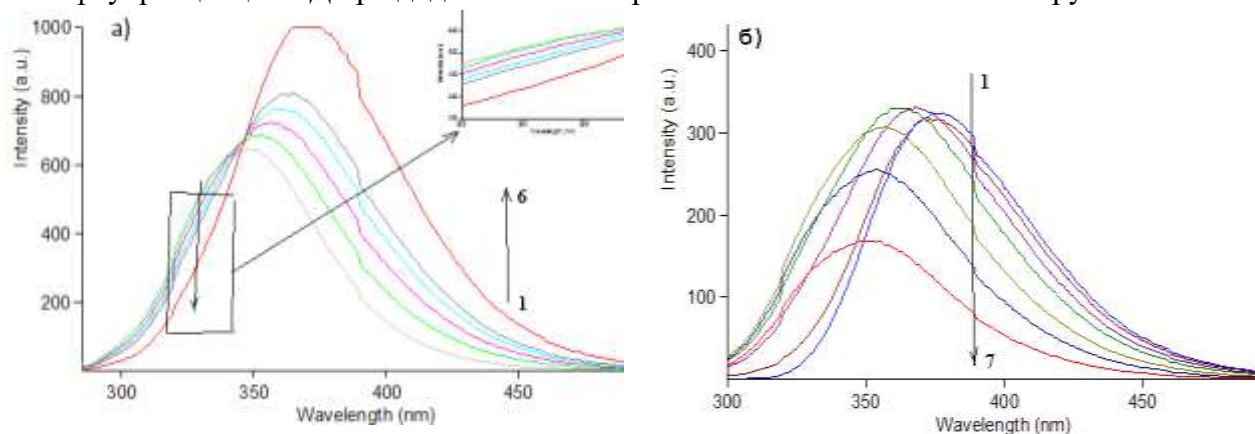


Рисунок 11. Спектри флуоресценції САЛ в присутності різних кількостей ІНД (а) та спектри флуоресценції ІНД в присутності різних кількостей САЛ (б)

На рисунку 12 представлені графіки залежності $\lg Y$ від $\lg X$, де Y і X визначаються за рівняннями (2) та (6) в першому і в другому випадках відповідно. Вони демонструють задовільні лінійні кореляції, з яких розраховано $\lg K$, і кількості місць зв'язування (n) в системі САЛ–ІНД для різних способів гасіння (таблиця 8). Показано, що значення констант зв'язування, визначених за гасінням САЛ, за гасінням ІНД, та літературні дані мають задовільну збіжність.

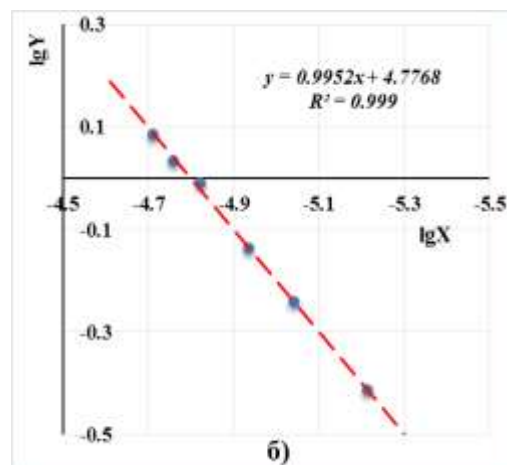
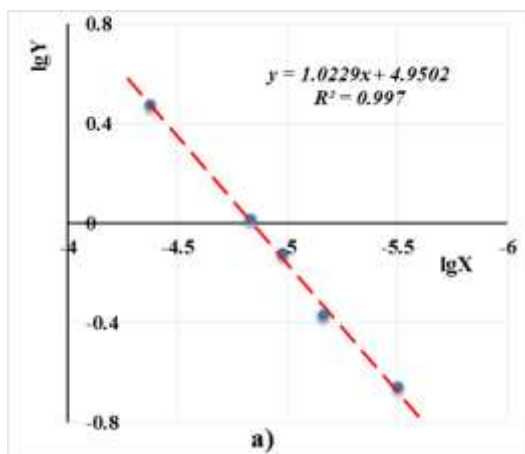


Рисунок 12. Логарифмічна лінеаризація закону діючих мас для розрахунку $\lg K$ і числа місць зв'язування САЛ–ІНД за гасінням флуоресценції САЛ (а) та за гасінням флуоресценції ІНД (б)

Таблиця 8

Значення $\lg K$ та кількості місць зв'язування (n), які визначалися в системі САЛ–ІНД для різних способів гасіння

Спосіб гасіння	$\lg K$	n
гасіння флуоресценції САЛ	4,95	1,02
гасіння флуоресценції ІНД	4,78	1,00
гасіння флуоресценції САЛ [літ]	4,74	1,15

Розроблено та валідовано високочутливу методику люмінесцентного визначення залишкових кількостей пропоксазепаму на поверхнях фармацевтичного обладнання (межа виявлення 0,5 мкг/мл).

У модельних досліджах в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим етанолом (96%), з поверхні (100 см²), на яку штучно наносили 0,20 мг РСЗ пропоксазепаму.

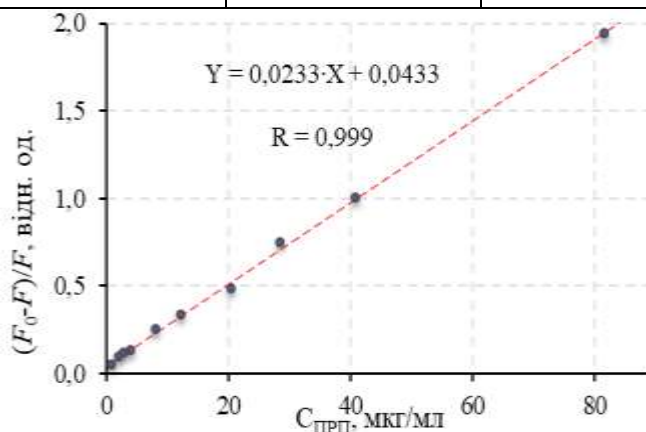


Рисунок 13. Градувальний графік для визначення пропоксазепаму в інтервалі концентрацій 0,80–80 мкг/мл

Далі вилучення пропоксазепаму проводили за методикою. В отриманому розчині люмінесцентним методом визначали вміст пропоксазепаму. Концентрацію (мкг/мл) пропоксазепаму в досліджуваному розчині визначали за градувальним графіком. Результати кількісного вилучення пропоксазепаму (ступінь вилучення 85% - 88%) наведені в таблиці 9.

Таблиця 9

Ступінь вилучення пропоксазепаму з модельної поверхні

Номер змиву	1	2	3	4	5
Ступінь вилучення пропоксазепаму, %	84,95	86,50	85,60	85,92	88,27

ВИСНОВКИ

Встановлено можливість та переваги застосування люмінесцентного методу аналізу для дослідження взаємодії лікарських речовин різних класів з біологічно активними макромолекулами (ДНК та сироватковим альбуміном людини) та розрахунку відповідних кількісних параметрів.

1. Вивчено спектральні властивості похідних 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти (L) та встановлено спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів іонів Tb(III) з ними. Встановлено, що при додаванні розчину ДНК до деяких комплексів Tb(III)-L відбувається збільшення інтенсивності люмінесценції. Це дозволило запропонувати відповідні тербієві комплекси у якості нових люмінесцентних зондів.

2. Методом конкуренції з новим лантанідним зондом Tb(III)-L₂ показано, що всі синтезовані аміноалкоксифлуоренони є інтеркаляторами ДНК. Визначено логарифми констант асоціації синтезованих сполук з ДНК. Проведено аналіз впливу будови аміноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренону на зміну константи зв'язування досліджуваних сполук з ДНК. Встановлено, що зміна кількості метиленових ланок у ланцюзі лінкеру в бічному фрагменті АФ призводить до достовірної зміни афінитету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК.

3. Встановлено, що люмінесцентний зонд Tb(III)-L₂ можна рекомендувати для високочутливого визначення ДНК, а також для вивчення зв'язування противірусних лікарських речовин з молекулами ДНК.

4. Проведено спектроскопічне вивчення взаємодії деяких ЛР з сироватковим альбуміном людини. Встановлено константи та число місць зв'язування, середні відстані між донорними та акцепторними молекулами для систем САЛ–ЛР. Визначено термодинамічні параметри зв'язування деяких ЛР з САЛ і встановлено, що важливу роль у зв'язуванні відіграють Ван-дер-Ваальсові взаємодії і утворення водневих зв'язків.

5. Методом синхронних спектрів флуоресценції показано, що практично для всіх ЛР спостерігаються зміни конформації білка поблизу залишку триптофану і практична відсутність зміни оточення залишку тирозину. Для системи САЛ–софосбувір спостерігається наявність змін конформації білка поблизу не тільки залишків триптофану, а й тирозину.

6. Уперше показана можливість визначення констант зв'язування САЛ з молекулами лікарських речовин за гасінням їх власної флуоресценції. Встановлено константи і число місць зв'язування, а також середню відстань між донорними та акцепторними молекулами у системах САЛ–індометацин і САЛ–даклатасвіру дигідрохлорид.

7. Із застосуванням флуоресцентного методу проведено вивчення взаємодії ЛР (тилорону, гідазепаму, феназепаму, левана, пропоксазепаму, діазепаму) з САЛ (звіти впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ»).

8. Розроблено та валідовано високочутливу методику люмінесцентного визначення залишкових кількостей пропоксазепаму на поверхнях фармацевтичного обладнання (межа визначення 0,5 мкг/мл). Методику впроваджено у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ».

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Новый люминесцентный зонд на основе комплекса тербия (III) для изучения аффинитета к ДНК аминалкоксифлуоренонов / А. В. Егорова, И. И. Леоненко, Ю. В. Скрипинец, В. П. Антонович, Г. В. Мальцев, И. В. Украинец, Д. И. Александрова // Журн. прикл. спектр. – 2013. – Т. 80, № 3. – С. 442–448.

2. Study on the interaction of 6-(2-morpholin-4-yl-ethyl)-6H-indolo [2,3-b]quinoxaline hydrochloride with human serum albumin by fluorescence spectroscopy /

A. Yegorova, I. Leonenko, Yu. Scrypnets, **G. Maltsev**, V. Antonovich // *Methods Appl. Fluoresc.* – 2016. – Vol. 4. – P. 034012.

3. Spectroscopic studies on the interaction between tilorone and human serum albumin / A. V. Yegorova, I. I. Leonenko, Yu. V. Scrypnets, **G. V. Maltsev**, V. P. Antonovich, S. N. Kashutskyu // *French-Ukrainian J. Chem.* – 2017. – Vol. 5, No. 1. – P. 48–58.

4. Спектроскопическое изучение взаимодействия долутегравира натрия с сывороточным альбумином человека / А. В. Егорова, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинец, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // *Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія.* – 2017. – Т. 22., вип. 4(64). – С. 15–28.

5. 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 // *Methods and objects of chem. anal.* – 2018. – Vol. 13, №. 1. – P. 18–28.

6. Спектроскопическое изучение взаимодействия индометацина и даклатавира дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека / А. В. Егорова, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинец, В. П. Антонович // *Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія.* – 2018 – Т. 23. Вип. 1(65). – С. 96 – 108.

7. Патент на корисну модель №125619, Україна МПК G01N33/00, G01N33/50 Спосіб флуоресцентного визначення константи зв'язування сироваткового альбуміну людини з індометацином / А. В. Егорова, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинець, В. П. Антонович; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатьського НАН України, – № u 2018 00707; заявл. 25.01.2018; опубл. 10.05.2018, Бюл. № 9.

8. Study on the interaction of tilorone with human serum albumin by fluorescence spectroscopy / A. Yegorova, I. Leonenko, Yu. Scrypnets, **G. Maltsev**, V. Antonovich, S. Kashutskyu // *Book of abstracts of 17th Conference on Methods and Applications of Fluorescence – Bruges-Belgium, 10-13 September, 2017.* – P. 127.

9. Спектроскопічне вивчення взаємодії долутегравіру натрію з сироватковим альбуміном людини / А. В. Єгорова, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинець, С. М. Кашуцький, В. П. Антонович // *Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18-21 жовтня, 2017.* – С. 162–163.

10. Флуоресцентне вивчення взаємодії софосбувіру з сироватковим альбуміном людини / А. А. Федосенко, А. В. Єгорова, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинець, В. П. Антонович // *Тези доповідей X Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2018» – Харків, 23–25 квітня, 2018.* – С. 81–82.

11. Флуоресцентное изучение взаимодействия даклатавира дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека / А. А. Федосенко, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинец, А. В. Егорова // *Тези доповідей XIII Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії – Харків, 2–4 травня, 2018.* – С. 73.

12. Флуоресцентне вивчення взаємодії діазепаму з сироватковим альбуміном людини / Ю. В. Скрипинець, **Г. В. Мальцев**, А. В. Єгорова, В. П. Антонович // *Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» – Харків, 12–13 квітня, 2018.* – С. 250 – 251.

13. Studies on the interaction HSA – propoxazepam and determination of its residues on equipment surfaces by fluorescence method / G. Fedosenko, **G. Maltsev**, A. Yegorova, Yu. Scrypnets, V. Antonovich // *Book of abstracts of 8 th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BVCAC) – Istanbul-Turkey, 9-11 May, 2018.* – P. 188.

АНОТАЦІЯ

Мальцев Г. В. Застосування люмінесцентного методу аналізу для вивчення взаємодії деяких лікарських речовин з ДНК та протеїнами. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. – Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, 2018.

Дисертаційну роботу присвячено вивченню взаємодії деяких лікарських речовин (ЛР) з ДНК та протеїнами з використанням люмінесцентного методу аналізу.

Вперше запропоновано новий люмінесцентний зонд – комплекс тербію (III) з похідним 2-оксо-4-гідроксохінолін-3-карбонової кислоти для вивчення інтеркаляції в ДНК ряду аміноалкоксифлуоренонів (АФ). Показано можливості та переваги нового люмінесцентного зонду. Вивчено спектральні характеристики деяких аміноалкоксифлуоренонів (АФ). Вивчено спектральні властивості похідних 2-оксо-4-гідроксохінолін-3-карбонової кислоти (L₁₋₈) та встановлено спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів іонів Tb(III) з ними. Показано, що при додаванні розчину ДНК до комплексу Tb(III)-L₂ відбувається збільшення інтенсивності люмінесценції в 10 разів. Методом конкуренції з новим лантанідним зондом показано, що всі синтезовані сполуки є інтеркаляторами ДНК, визначено логарифми констант асоціації синтезованих сполук з ДНК.

Взаємодію ЛР з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка (гасіння) при додаванні ЛР. Значення констант і кількості місць зв'язування ЛР–САЛ визначено для різних температур. З цих результатів розраховано значення термодинамічних параметрів ΔH° , ΔS° та ΔG° для аддуктів ЛР–САЛ. Негативні значення змін ентальпії та ентропії для досліджуваних сполук свідчать про те, що важливу роль у зв'язуванні відіграють Ван-дер-Ваальсові взаємодії і утворення водневих зв'язків.

Проведено вивчення конформаційних змін САЛ, викликаних зв'язуванням з ЛР, шляхом вимірювання синхронних спектрів флуоресценції. Показано, що практично для всіх ЛР спостерігаються зміни конформації білка поблизу залишку триптофану і практична відсутність зміни оточення залишку тирозину.

Розроблено підхід, що полягає в гасінні власної флуоресценції ліганду при додаванні протеїну та розрахунковий апарат для визначення параметрів зв'язування. У разі ЛР (індометацин, даклатасвиру дигідрохлорид), для яких відбувається накладення їх спектру емісії на власну флуоресценцію білка, показана можливість визначення констант зв'язування САЛ з молекулами лікарських речовин по гасінню їх власної флуоресценції. Встановлено константи і число місць зв'язування, а також середню відстань між донорними і акцепторними молекулами в системах САЛ–індометацин і САЛ–даклатасвиру дигідрохлорид.

Розроблено та валідовано високочутливі методики люмінесцентного визначення ДНК із застосуванням люмінесцентного зонду Tb(III)-L₂ (межа виявлення 30 нг/мл) та залишкових кількостей пропоксазепаму на поверхнях фармацевтичного обладнання (межа виявлення 0,5 мкг/мл).

Ключові слова: ДНК, люмінесцентний зонд, комплексні сполуки тербію, сироватковий альбумін людини, флуоресценція, лікарські речовини.

АННОТАЦИЯ

Мальцев Г. В. Применение люминесцентного метода анализа для изучения взаимодействия некоторых лекарственных веществ с ДНК и белками. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. – Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, 2018.

Диссертационная работа посвящена изучению взаимодействия некоторых лекарственных веществ (ЛВ) с ДНК и белками с использованием люминесцентного метода анализа.

Впервые предложен новый люминесцентный зонд – комплекс тербия (III) с производным 2-оксо-4-гидрокси-3-карбоновой кислоты для изучения интеркаляции в ДНК ряда аминоксифлуоренонов (АФ). Показаны возможности и преимущества нового люминесцентного зонда. Изучены спектральные свойства производных 2-оксо-4-гидрокси-3-карбоновой кислоты (L₁₋₈) и установлены спектрально-люминесцентные характеристики комплексов ионов Tb(III) с ними. Показано, что при добавлении раствора ДНК к комплексу Tb(III)-L₂ происходит увеличение интенсивности люминесценции в 10 раз. Методом конкуренции с новым лантанидным зондом показано, что все синтезированные соединения являются интеркаляторами ДНК, определены логарифмы констант ассоциации синтезированных соединений с ДНК.

Взаимодействие ЛВ с САЧ оценивали, фиксируя изменения интенсивности собственной флуоресценции белка (тушение) при добавлении ЛВ. Значения констант и количества мест связывания ЛВ–САЧ были определены для различных температур. Из этих результатов были рассчитаны значения термодинамических параметров ΔH° , ΔS° и ΔG° для аддуктов ЛВ–САЧ. Отрицательные значения изменений энтальпии и энтропии для исследуемых соединений свидетельствуют о том, что важную роль в связывании играют Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и образование водородных связей.

Проведено изучение конформационных изменений САЧ, вызванных связыванием с ЛВ путем измерения синхронных спектров флуоресценции. Показано, что практически для всех ЛВ наблюдаются изменения конформации белка около остатка триптофана и практическое отсутствие изменения окружения остатка тирозина.

Был разработан подход, заключающийся в тушении собственной флуоресценции лиганда при добавлении протеина и расчетный аппарат для определения параметров связывания. В случае ЛВ (индометацин, даклатавира дигидрохлорид), для которых происходит наложение их спектра эмиссии на собственную флуоресценцию белка, показана возможность определения констант связывания САЧ с молекулами лекарственных веществ по тушению их собственной флуоресценции. Установлены константы и число мест связывания, а также среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами в системах САЧ–индометацин и САЧ–даклатавира дигидрохлорид.

Разработаны и валидированы высокочувствительные методики люминесцентного определения ДНК с применением люминесцентного зонда Tb(III)-L₂ (предел обнаружения 30 нг/мл) и остаточных количеств пропоксазепам на поверхностях фармацевтического оборудования (предел обнаружения 0,5 мкг / мл).

Ключевые слова: люминесцентный зонд, комплексные соединения тербия, сывороточный альбумин человека, флуоресценция, лекарственные вещества.

SAMMARY

Maltsev G.V. Application of the luminescent method of analysis to study the interaction of some drugs with DNA and proteins. – As a manuscript.

The thesis for the candidate's degree of chemical sciences (Ph.D.) by the specialty 02.00.02 – analytical chemistry (102 - Chemistry). – A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Odessa, 2018.

The thesis is devoted to the study of the interaction of some medicinal substances (MS) with DNA and proteins using the luminescence method of analysis.

A new luminescent probe-terbium (III) complex with the 2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acid derivative was proposed for the first time to study of the intercalation in the DNA of a number of aminoalkoxy fluorenones (AF). The possibilities and advantages of a new luminescent probe have been shown. The spectral properties of the derivatives of 2-oxo-4-hydroxy-3-carboxylic acid (L₁₋₈) have been studied and the spectral-luminescent characteristics of the complexes of Tb (III) ions with them have been established. It is shown that when the DNA solution is added to the Tb (III)-L₂ complex, the luminescence intensity increases by a factor of 10. By the method of competition with a new lanthanide probe showed that all synthesized compounds are DNA intercalators, logarithms of the constants of association of synthesized compounds with DNA have been determined.

The interaction of MS with HSA has been evaluated by fixing the changes in the intrinsic fluorescence intensity of the protein (quenching) with the addition of MS. The values of the constants and the number of binding sites of MS-HSA have been determined for different temperatures. From these results, the values of the thermodynamic parameters ΔH° , ΔS° and ΔG° for adducts MS-HSA have been calculated. Negative values of enthalpy and entropy changes for the compounds under study suggest that Van der Waals interactions and the formation of hydrogen bonds play an important role in the binding. Conformational changes in HSA caused by binding to MS by measuring synchronous fluorescence spectra have been studied. It is shown that changes in protein conformation near the tryptophan residue are observed practically for all MS and practically no change in the environment of the tyrosine residue. An approach has been developed that is to quench the intrinsic fluorescence of the ligand upon addition of the protein and the calculating apparatus for determining the binding parameters. In the case of MS (indomethacin, daclatasvir dihydrochloride), for which their emission spectrum is superimposed on the intrinsic fluorescence of the protein, the possibility of determining the binding constants of HSA with drug molecules by quenching their intrinsic fluorescence have been demonstrated. The constants and number of binding sites, as well as the average distance between the donor and acceptor molecules in the HSA-indometacin and HSA-daclatasvir dihydrochloride systems have been established. The highly sensitive methods of luminescent DNA determination using a luminescent probe Tb (III) -L₂ (limit of detection 30 ng/ ml) and determination of residual quantities of propoxazepam on the surfaces of pharmaceutical equipment (limit of detection 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) have been developed and validated .

Key words: luminescent probe, terbium complex compounds, human serum albumin, fluorescence, medicinal substances.