

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАЛЬЦЕВ ГЕОРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 543.482.6: 665.939.1: 577.113:546.663:541.49

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

02.00.02 – аналітична хімія

10 – Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (кандидата наук)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Г. В.Мальцев

Науковий керівник Антонович Валерій Павлович, доктор хімічних наук,
професор

Одеса – 2018

АНОТАЦІЯ

Мальцев Г. В. Застосування люмінесцентного методу аналізу для вивчення взаємодії деяких лікарських речовин з ДНК та протеїнами. – Кваліфікаційна наукова праця 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 з ДНК та протеїнами з використанням люмінесцентного методу аналізу.

Одним з ефективних методів контролю гомеостазу живих систем є люмінесцентний метод. Методи дослідження флуоресценції біоактивних речовин мають високу чутливість, яка перевищує чутливість радіоізотопного та імуноферментного методів. 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 (ЛР) та протеїнами, оскільки міжмолекулярні взаємодії змінюють оточення білка-флуорофора. У разі сироваткового альбуміну людини (САЛ) флуорофор є залишком триптофану (Trp214), який дуже чутливий 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 основну інформацію щодо фармакологічної дії, біоперетворення та біорозподілу лікарських засобів.

Вперше запропоновано новий люмінесцентний зонд – комплекс іонів

тербію (III) з похідним 2-оксо-4-гідроксохінолін-3-карбонової кислоти замість коштовного і токсичного етидію броміду для вивчення інтеркаляції в ДНК ряду аміноалкоксіфлуоренонів (АФ). Показано можливості та переваги нового люмінесцентного зонда.

Вперше для низки бенздіазепінів (БД) і противірусних препаратів люмінесцентним методом встановлено характер їх взаємодії з САЛ, визначено число місць і константи зв'язування, відстані між донором (САЛ) і акцептором (БД). Запропоновано новий спосіб люмінесцентного визначення параметрів взаємодії САЛ з деякими лікарськими препаратами, для яких є характерним перекривання їх спектрів флуоресценції зі спектрами емісії САЛ.

Вивчено спектральні характеристики деяких аміноалкоксіфлуоренонів (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. Вивчено спектральні властивості похідних 2-оксо-4-гідроксіхінолін-3-карбонової кислоти (L_{1-8}). Встановлено спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів іонів Tb(III) з похідними 2-оксо-4-гідроксіхінолін-3-карбонової кислоти. Показано, що при додаванні розчину ДНК до комплексу Tb(III)- L_2 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. Для підтвердження правильності визначення констант зв'язування з ДНК з використанням люмінесцентного зонду на основі комплексної сполуки тербію Tb(III)- L_2 було проведено аналогічне дослідження для деяких АФ з використанням етидію броміду. Статистичним методом двохфакторного дисперсійного аналізу проведено порівняння результатів за F -критерієм, показано, що розбіжність між величинами констант асоціації АФ з ДНК, отриманих двома методами, є незначною на рівні 99%-ої ймовірності. Таким

чином встановлено, що даний люмінесцентний зонд Tb(III)-L₂ може бути рекомендованим для високочутливого визначення ДНК, а також для вивчення зв'язування протівірусних лікарських речовин з молекулами ДНК.

На підставі отриманих даних проведено аналіз впливу будови нових АФ (кількість метиленових ланок у ланцюзі лінкера та природа термінальної групи) на варіацію константи зв'язування досліджуваних сполук з нуклеїновими кислотами за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA). Встановлено, що зміна кількості метиленових ланок у ланцюзі лінкера у бічному фрагменті призводить до достовірної зміни афінитету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК.

Взаємодію ЛР з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка (гасіння) при додаванні ЛР. Емісія САЛ характеризується широкою смугою за довжини хвилі 346 нм. При збільшенні концентрації ЛР інтенсивність флуоресценції САЛ помітно зменшується. Аналіз зміни емісії САЛ за різних концентрацій ЛР проводився за рівнянням Штерна-Фольмера. Величини констант швидкості гасіння мають розмірність 10^{12} л·моль⁻¹·с⁻¹. Ця величина є більшою, ніж константа дифузії біополімерів 10^{10} л·моль⁻¹·с⁻¹, яка лімітує швидкість зіткнень. Це вказує на те, що гасіння флуоресценції САЛ не викликано динамічними зіткненнями, а відбувається за статичним механізмом, тобто за рахунок оборотного зв'язування протеїну з *n* молекулами ліганду 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 низкою еквівалентних місць макромолекули.

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. 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. Показано, що практично для всіх ЛР спостерігаються зміни конформації білка поблизу залишку триптофану і практична відсутність зміни оточення залишку тирозину. Для системи софосбувір-САЛ спостерігається наявність змін конформації білка поблизу не тільки залишків триптофану, а й тирозину.

Ефективність передачі енергії між ЛР і залишком триптофану САЛ може бути застосовано для оцінки відстані (r) між ними з використанням теорії резонансного переносу енергії флуоресценції (FRET). Проведено співставлення результатів флуоресцентного методу аналізу з рентгеноструктурними дослідженнями. Для комплексу САЛ-діазепам відомі дані щодо його будови, яке було визначено рентгеноструктурним методом. Усереднена відстань (r) між залишком триптофану та діазепамом, визначена з використанням рентгенівської кристалографії, становить 1,91 нм. Цей результат задовільно узгоджується з величиною відстані між донором і акцептором в системі САЛ-діазепам, визначеному за FRET флуоресцентним методом аналізу, а саме 1,76 нм. Різниця у значеннях r , отриманих шляхом аналізу флуоресцентного гасіння і рентгенівської дифракції, становить 0,15 нм, що відповідає роздільній здатності рентгеноструктурного методу (0.295 нм).

Здатність флуоресцентного методу аналізу визначати 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 рентгенівській кристалографії для аналізу взаємодії ЛР-протеїн. З огляду на потребу фармацевтичної промисловості в стандартизованих процедурах вивчення зв'язування ЛР з білками, можна рекомендувати використання флуоресцентного методу аналізу для первинної оцінки потенційних взаємодій ксенобіотиків і САЛ.

Спосіб флуоресцентного аналізу, що базується на ефекті статичного

гасіння власної флуоресценції протеїну «малими молекулами», стає непридатним у разі, якщо відбувається перекривання (часткове або повне) спектрів флуоресценції біомакромолекули та ліганда. Було розроблено підхід, що полягає в гасінні власної флуоресценції ліганда при додаванні протеїну та математичний апарат для розрахунку параметрів зв'язування. У разі ЛР (індометацин, даклатасвіру дигідрохлорид), для яких відбувається накладення їхнього спектру емісії на власну флуоресценцію білка, показано можливість визначення констант зв'язування САЛ з молекулами лікарських речовин з гасіння їхньої власної флуоресценції. Встановлено константи і число місць зв'язування, а також середню відстань між донорними і акцепторними молекулами в системах САЛ-індометацин і САЛ-даклатасвір.

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). Концентрації аналітів визначали за градувальними графіками. Для розроблених методик встановлено їх аналітичні та валідаційні характеристики (діапазон лінійності методики, межі кількісного визначення).

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

SUMMARY

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 drugs with DNA and proteins using a luminescent method of analysis.

One of the effective methods for monitoring the homeostasis of living systems is the luminescent method. The methods for studying the fluorescence of bioactive substances has a high sensitivity that exceeds the sensitivity of radioisotope and immunoenzyme methods. The fluorescence method of analysis along with the method of radioactive labeling and spectrophotometry are often used to study the chemical structure and physical and chemical properties of nucleic acids. Detailed study of nucleic acids and their interaction with “small molecules” allow to solve a number of problems of medical chemistry, in particular, the development of antiviral drugs.

Fluorescent spectroscopy is one of the methods used to study the interaction between drugs and proteins, since intermolecular interactions alter the protein-fluorophore environment. In the case of human serum albumin (HSA), the fluorophore is a tryptophan residue (Trp214), which is very sensitive to its local environment and can be used to observe changes in fluorescence spectra due to conformational changes in the protein when bound to substrates. The study of the interaction between proteins and drug molecules can provide basic information on pharmacological action, bioconversion and biodistribution of drugs.

For the first time, a new luminescent probe was proposed – a complex of terbium (III) with the derivative of 2-oxo-4-hydroxycholinine-3-carboxylic acid instead of the expensive and toxicity of etidium bromide for studying the intercalation in DNA a number of aminoalkoxyfluorenones (AF). The possibilities and advantages of the new luminescent probe are shown. For the first time, the

nature of the interaction with HSA for series of benzodiazepines (BD) and antiviral drugs by the luminescent method has been established, the number of sites and the binding constant, the distance between the donor (HSA) and the acceptor (BD) have been determined. A new method of luminescent determination of parameters of interaction of HSA with some medicinal preparations, which is characterized by overlapping of their spectra of fluorescence with the emission spectra of HSA has been proposed.

The spectral characteristics of some aminoalkoxy fluorenone (AF) – new potential antiviral preparations, analogues of the thiloron – in aqueous solutions have been studied. It is shown that absorption spectra are characterized by the presence of bands in a ultraviolet and visible regions with high molar absorption coefficients. The spectral properties of derivatives of 2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acid (L_{1-8}). The spectral-luminescent characteristics of complexes of Tb(III) ions with derivatives of 2-oxo-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acid have been established. It is shown that when the solution of DNA is added to the Tb(III)- L_2 complex there is an increase the luminescence intensity by 10 times. The method of competition with the new lanthanide probe shows that all the synthesized compounds are intercalators of DNA, and the logarithms of the constants of the association of synthesized DNA compounds have been determined. A similar study was carried out for some AF using ethidium bromide to confirm the correct determination of DNA binding constants using a luminescent probe based on the complex compound of terbium Tb(III)- L_2 . The statistical method of the two factor analysis of variance compared the results with the *F*-criterion, it was shown that the difference between the values of the constants of association of AF with DNA obtained by two methods is insignificant at the 99% probability level. Thus, it has been established that this luminescent probe Tb(III)- L_2 can be recommended for highly sensitive DNA detection, as well as for the study of the binding of antiviral drugs to DNA molecules.

On the basis of the obtained data, an analysis of the effect of the structure of the new AF (the number of methylene linkages in the linker chain and the nature

of the terminal group) was carried out on the variation of the coupling constant of the investigated compounds with nucleic acids using a analysis of variance (ANOVA). It was established that the change in the amount of methylene links in the linker chain in the lateral fragment results to a significant change in the affinity of aminoalkoxy fluorenones to DNA.

The interaction of medicinal substances with HSA was evaluated by fixing the changes in the intensity of its own fluorescence of the protein (quenching) when added to the drugs. The HSA emission is characterized by a wide band at wavelength 346 nm. With an increase in the concentration of medicinal substances, the fluorescence intensity of HSA significantly decreases. The analysis of the change in the emission of HSA at various concentrations of medicinal substances was carried out by the Stern-Volmer equation. The values of the constant of the quenching rate have a dimension of $10^{12} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. This value is greater than the constant of the diffusion of biopolymers $10^{10} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, which limits the collision rate. This indicates that the quenching of the fluorescence of the HSA is not caused by a dynamic collision, but occurs in a static mechanism, that is, by the inverse binding of the protein with n molecules of the ligand in the ground state. The binding process is characterized by a constant of equilibrium K , which is determined by equilibrium concentrations according to the law of active masses, when “small molecules” independently bind to a number of equivalent places of the macromolecule.

The values of the constants and a number of binding sites of HSA drugs were determined for different temperatures. Values of thermodynamic parameters ΔH° , ΔS° and ΔG° for drugs-HSA adducts were calculated from these results. Negative values of enthalpy and entropy for the investigated compounds indicate that Van der Waals interactions and the formation of hydrogen bonds play an important role in the binding. This standardized study the interaction between HSA and medicinal substances is useful for the pharmaceutical industry and clinical medicine.

The study of conformational changes of HSA caused by binding with drugs

by measuring synchronous fluorescence spectra was carried out. It has been shown that for practically all medicinal substances there are changes in the conformation of the protein around tryptophan residues and the practical absence of a change in the environment of the residue of tyrosine. The changes of protein conformation not only around of the tryptophan residues and tyrosine too is observed for a system sofosbuvir-HSA.

The efficiency of the energy transfer between drugs and tryptophan residue of HSA can be used to estimate the distance (r) between them using the theory of fluorescence resonance energy transfer (FRET). A comparison of the results of the fluorescence analysis method with X-ray diffraction studies was performed. For complex diazepam HSA-known details of its structure, which was determined by X-ray method. The average distance (r) between the residues of the tryptophan and diazepam, determined using X-ray crystallography, is 1.91 nm. This result is consistent with the value of the distance between donor and acceptor system HSA-diazepam determined by FRET fluorescence method of analysis – 1.76 nm. The difference in values r obtained by analyzing fluorescent quenching and X-ray diffraction is 0.15 nm, which corresponds to the resolution of the X-ray diffraction method (0.295 nm).

The ability of the fluorescence analysis method to determine the presence of interaction of drugs with albumin, as well as the almost identical estimation of the distance between the drug and the protein, determined by this method and direct X-ray measurement, suggest that the fluorescence spectroscopy as an alternative to X-ray crystallography for the analysis of the interaction of drugs with proteins. Given the need for the pharmaceutical industry in standardized procedures for studying the binding of drugs to proteins, we can recommend the use of fluorescent analysis method for initial evaluation of potential interactions of xenobiotics and HSA.

The method of fluorescence analysis, based on the effect of static quenching of the own fluorescence of the protein by “small molecules”, becomes inappropriate in the event of overlapping (partial or complete) spectra of the

fluorescence of the biomacromolecule and the ligand. An approach was developed to quench its own fluorescence of a ligand with the addition of a protein and a mathematical apparatus for calculating binding parameters. If drugs (indomethacin, daclatasvir dihydrochloride), for which there is the imposition of emission spectrum on its own fluorescence protein shown the ability to determine the binding constants of HSA molecule drugs to quench their intrinsic fluorescence. The constants and number of binding sites and the average distance between donor and acceptor molecules in systems indomethacin-HSA and HSA-daclatasvir were established .

The highly sensitive methods of luminescent DNA determination using a luminescent probe Tb (III) -L₂ (limit of determination 30 ng/ ml) and determination of residual quantities of propoxazepam on the surfaces of pharmaceutical equipment (limit of determination 0.5 µg/ml) have been developed and validated . Concentrations of analytes were determined by calibration curves. For the developed methods, their analytical and validation characteristics (the range of linearity of the method, the limits of the determination) have been established.

Keywords: DNA, luminescent probe, complex compounds of terbium, human serum albumin, fluorescence, medicinal substances.

Список публікацій здобувача:

1. Новый люминесцентный зонд на основе комплекса тербия (III) для изучения аффинитета к ДНК аминокислот флуоренонов / 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 Scrypynets, **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. Scrypynets, **G. V. Maltsev**, V. P. Antonovich, S. N. Kashutskyy // French-Ukrainian J. Chem. – 2017. – Vol. 5, No. 1. – P. 48 – 58.
4. Спектроскопическое изучение взаимодействия долутегавира 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 индометасина и даклатасвира 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. Scrypynets, **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 даклатасвира дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека / А. А. Федосенко, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинець, 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. Scrypynets, V. Antonovich // Book of abstracts of 8 th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BBCAC) – Istanbul-Turkey, 9-11 May, 2018. – P. 188.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	16
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ У БІОАНАЛІЗІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	22
1.1 Застосування люмінесцентних зондів для визначення нуклеїнових кислот і вивчення їх взаємодії з молекулами лікарських препаратів.....	22
1.1.1 Загальна характеристика будови ДНК і фізико-хімічні аспекти інтеркаляції в ДНК.....	22
1.1.2 Люмінесцентні органічні барвники.....	29
1.1.3 Лантанідні люмінесцентні зонди.....	32
1.2 Дослідження взаємодії молекул лікарських препаратів з білками.....	34
1.2.1 Загальна характеристика флуоресценції білків.....	34
1.2.2 Гасіння флуоресценції.....	41
1.2.3 Оцінка параметрів зв'язування з білками різних «малих молекул».....	47
1.3 Висновки до розділу 1.....	52
РОЗДІЛ 2 РЕАКТИВИ ТА АППАРАТУРА.....	54
2.1 Вихідні сполуки та матеріали.....	54
2.2 Апаратура та обладнання.....	56
РОЗДІЛ 3. КОМПЛЕКСИ ЛАНТАНІДІВ З ПОХІДНИМИ АМІДІВ ОКСОХІНОЛІНКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ – ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ АФІНІТЕТУ АМІНОАЛКОКСИФЛУОРЕНОНІВ ДО ДНК ТА ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ...	58
3.1 Спектральні властивості нових аміноалкоксифлуоренонів.....	58

3.2	Спектральні характеристики похідних амідів оксохінолінкарбонової кислоти та їх комплексів з іонами тербію (III) та ДНК.....	66
3.3	Результати вивчення афінітету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК з новим лантанідним зондом.....	73
3.4	Визначення ДНК у модельних розчинах.....	89
3.5	Висновки до розділу 3.....	92
РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ ЛЮДИНИ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ.....		93
4.1	Електронні спектри поглинання.....	93
4.2	Гасіння флуоресценції.....	98
4.3	Визначення констант зв'язування лікарських речовин з САЛ... ..	106
4.4	Синхронна флуоресцентна спектроскопія.....	109
4.5	Резонансне перенесення енергії флуоресценції.....	113
4.6	Розрахунок констант зв'язування за гасінням власної флуоресценції лікарської речовини.....	117
4.7	Визначення залишкових кількостей пропоксазепаму в змивах після очищення фармацевтичного обладнання.....	123
4.8	Висновки до розділу 4.....	127
ВИСНОВКИ.....		129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....		131
ДОДАТОК 1 Акти впровадження.....		153
ДОДАТОК 2 Список публікацій здобувача.....		155

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

- АФ – алкіламіноалкоксипохідні 2,7-діоксифлуоренону
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- БД – бенздіазепіни
- ГІД – гідазепам
- ДАК – даклатасвіру дигідрохлорид
- ДЗП – діазепам
- ДН – долутегравір натрію
- ІНД – індометацин
- ЛЕВ – левана
- ЛР – лікарські речовини
- ЛП – лікарські препарати
- МОР – мориноксин
- МВ – межа визначення
- ПРП – пропоксазепам
- РСЗ – робочий стандартний зразок
- САЛ – сироватковий альбумін людини
- ТИЛ – тилорон
- СОФ – софосбувір
- ФЕН – феназепам
- F – інтенсивність люмінесценції
- FRET (Fluorescence (Förster) Resonance Energy Transfer) – безвипромінювальне перенесення енергії електронного збудження
- GMP – Good Manufacturing Practice (GMP) (належна виробнича практика)
- L – ліганд
- Tris-HCl – три(гідроксиметил)амінометан хлористоводнева кислота
- τ – час життя збудженого стану
- ε – молярний коефіцієнт поглинання
- $\lambda_{\text{збуд}}$ – довжина хвилі збудження
- $\lambda_{\text{еміс}}$ – довжина хвилі люмінесценції

ВСТУП

Ефективним методом контролю гомеостазу живих систем є люмінесцентний метод. Методи дослідження флуоресценції біоактивних речовин мають високу чутливість, а також зручний часовий діапазон, так як емісія відбувається за 10^{-8} с (10 нс) після поглинання світла. За цей час відбувається безліч різних молекулярних процесів, які впливають на спектральні характеристики сполуки, здатної до флуоресценції. Чутливість флуоресценції часто перевершує чутливість радіоізотопного та імуноферментного методів. Крім того, дослідження флуоресценції дозволяє отримати інформацію про стан живих систем, не пошкоджуючи їх, та не вимагає великої кількості біологічного матеріалу. Маючи такі переваги, флуоресцентні методи дозволяють ефективно вирішувати багато завдань клінічної діагностики, екологічного контролю та біоаналітичної хімії, все ширше застосовуються в медичних та біохімічних дослідженнях.

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. У 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 акцептором (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.

Автор вдячний за допомогу у виконанні експериментальної частини роботи співробітникам НДАЛ (ТДВ «ІНТЕРХІМ») – к.х.н. Ю. В. Скрипинець, к.х.н. І. І. Леоненко. Автор висловлює щирі подяки д.х.н., професору А. В. Єгоровій (Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України) за корисні рекомендації та критичні зауваження.

Апробація результатів дисертації

Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися на Київській 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 BBSAC) (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 із 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.

РОЗДІЛ 1

ДЕЯКІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ У БІОАНАЛІЗІ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

В останні роки в хімічних і біологічних дослідженнях флуоресцентні мітки витісняють радіоізотопні. Таке положення пов'язане з низкою переваг флуоресцентних міток – стабільністю, високою чутливістю визначення (порівнянної з чутливістю радіоізотопних міток і навіть перевищує її), можливістю автоматизації процедур модифікації та детекції, одночасного визначення декількох сполук, мічених різними флуорофорами, а також меншим негативним впливом на навколишнє середовище.

Широке застосування отримали флуоресцентні мітки в дослідженнях нуклеїнових кислот і протеїнів. Однак, в теперішній час їх використання в більшості випадків обмежується детекцією оліго- або полінуклеотидної частини кон'югатів і набагато рідше застосовується для дослідження структурних змін в процесі різних взаємодій: гібридизації нуклеїнових кислот з утворенням дуплексів або триплексів, взаємодії з білками і змішаними біополімерами.

1.1 Застосування люмінесцентних зондів для визначення нуклеїнових кислот і вивчення їх взаємодії з молекулами лікарських препаратів

1.1.1 Загальна характеристика будови ДНК і фізико-хімічні аспекти інтеркаляції в ДНК

Нуклеїнові кислоти – біологічні полімерні молекули, що зберігають всю інформацію про окремий живий організм, визначають його зростання і розвиток, а також спадкові ознаки. Нуклеїнові кислоти є в ядрах клітин усіх рослинних і тваринних організмів, що визначило їх назву (лат. nucleus – ядро). За своєю структурою ДНК нагадує подвійну закручену спіраль. Вона складається з двох дуже тонких ниток, які з'єднано перемичками. Структурними одиницями цієї спіралі є нуклеотиди. Кожен нуклеотид

складається з трьох частин: цукру, залишку фосфорної кислоти і азотистої основи (аденіну, тиміну, цитозину або гуаніну).

Дві пари основ, аденін – тимін і цитозин – гуанін, з'єднуються між собою за допомогою водневого зв'язку, утворюють сходинки спіральних сходів. Залишки фосфорної кислоти утворюють перила сходів, а молекули цукру є сполучними ланками одного ланцюга молекули ДНК.

Нуклеїновий склад ДНК в 1905 р вперше проаналізував англійський біохімік Едвін Чиграфф. Він виявив, що нуклеотиди розташовані один за одним на відстані 0,34 нм, а на один виток спіралі доводиться 10 нуклеотидів. Діаметр молекули ДНК становить 2 нм. Подвійні ланцюги закручені один навколо іншого і разом навколо загальної осі (рисунок 1.1).

У 1953 році американський біохімік Дж. Уотсон і англійський фізик Ф. Крик, досліджуючи молекулу ДНК, прийшли до висновку, що на периферії молекули ДНК знаходиться цукрофосфатний остов, а в середині – пуринові і піримідинові основи [1]. При цьому останні орієнтовані таким чином, що між основами на протилежних ланцюгах можуть утворюватися водневі зв'язки. Саме ними були вперше охарактеризовано деталі структури ДНК. І саме в англійській літературі вперше з'явилися терміни “minor groove” (“малий жолоб”) та “major groove” (“великий жолоб”).

Подвійна спіраль ДНК являє собою жорстку структуру. Дві ланцюга ДНК утримуються разом за рахунок утворення безлічі слабких водневих зв'язків між парами нуклеотидів.

Фізико-хімічні аспекти інтеркаляції в ДНК

Планарні ароматичні фрагменти амінокислотних залишків білків, вклинюючись між двома сусідніми парами основ і перешкоджаючи тим самим їх зворотному "хляпанню", досить ефективно утримують подвійну спіраль ДНК в вигнутому стані. Такий процес вклинювання планарних ароматичних фрагментів між двома сусідніми парами основ отримав назву інтеркаляції.

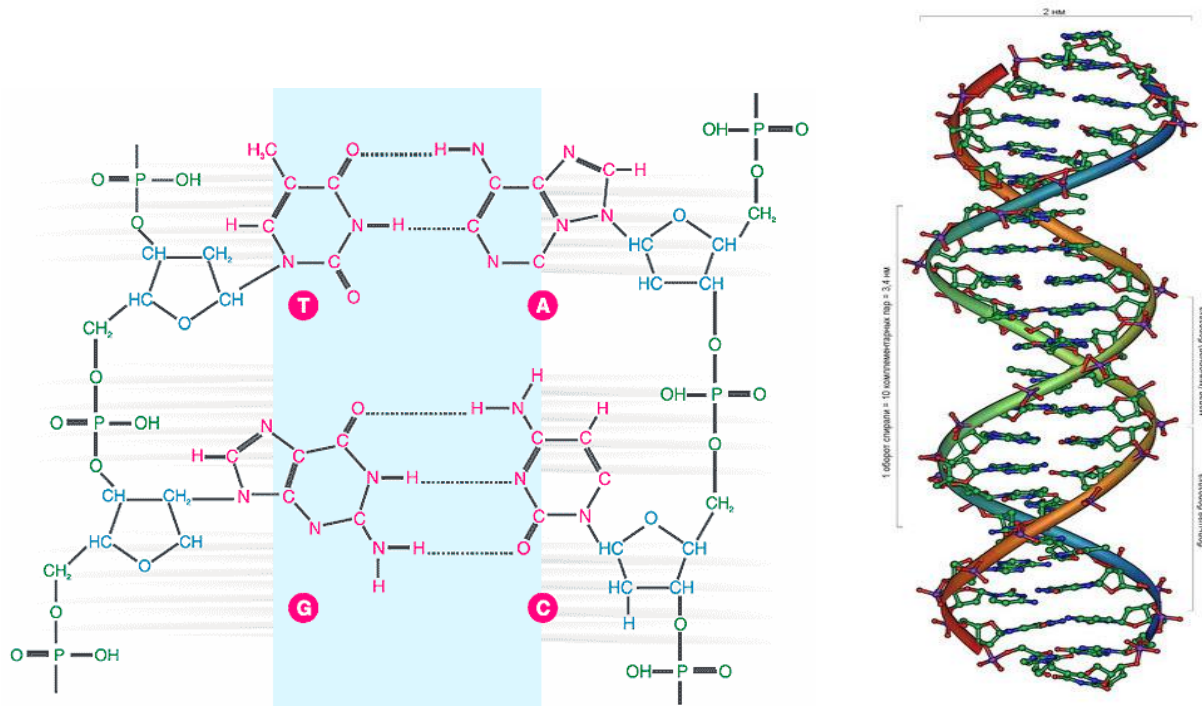


Рисунок 1.1 – Подвійна спіраль ДНК

Цей природний процес виявлено у другій половині минулого століття при вивченні взаємодії ДНК зі специфічними барвниками. Інтеркаляція відіграє істотну роль і в реалізації біологічної активності низки лікарських препаратів, що мають протипухлинну, протівірусну і інтерфероніндуціюючу активність.

У класичній молекулярній біології і генетиці термін «інтеркаляція» відповідає вставці у послідовність ДНК нової основи, що супроводжується зміною хімічної структури ДНК (в строгому сенсі цього терміна), рамки зчитування, послідовності амінокислот в кодованому білку і іншими наслідками (як правило, негативного характеру). Така інтеркаляція розглядається як один з молекулярних механізмів мутагенезу.

З іншого боку, Лерман [2] виявив збільшення в'язкості розчинів ДНК в присутності зростаючих концентрацій профлавіна (рисунок 1.2). Аналіз кількісних закономірностей цього явища, його оборотний характер і відновлення молекулярно-біологічних характеристик ДНК після видалення

профлавіна діалізом дозволив йому запропонувати комплекс включення низькомолекулярного речовини в ДНК, при якому плоска молекула ліганда впроваджується між двома сусідніми парами основ (рисунок 1.2) таким чином, що її площина виявляється приблизно перпендикулярною до осі спіралі [3]. Ні хімічна структура ДНК, ні водневі зв'язки, які утримують основи в комплементарних парах, в цьому випадку не порушуються, а змінюється тільки конформація подвійної спіралі. Такий комплекс включення Лерман назвав «інтеркаляційним», процес його утворення – «інтеркаляцією», а ліганд, здатний таким чином взаємодіяти з ДНК – «інтеркалятором».

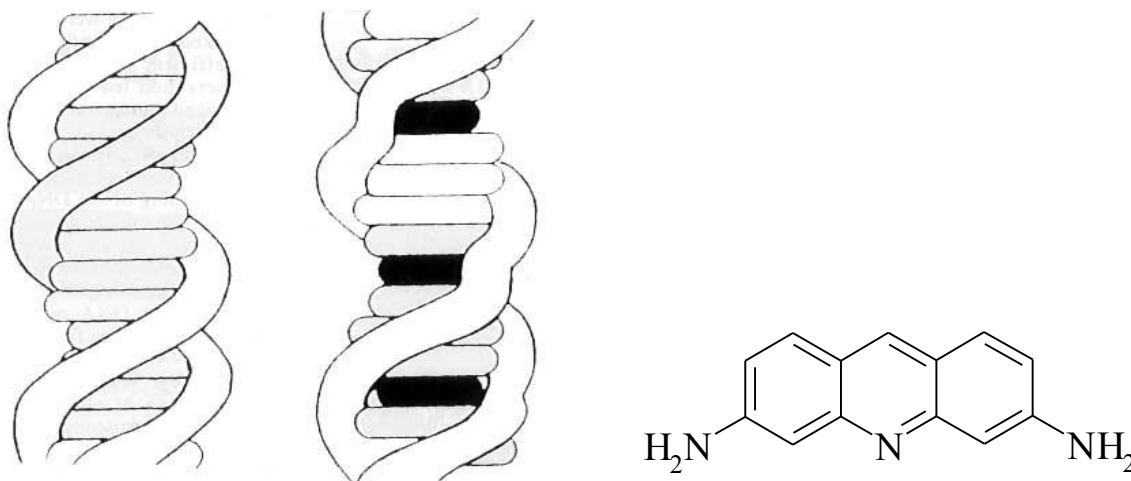


Рисунок 1.2 – Схема інтеркаляції за Лерманом [2] і структура профлавіна

Обидві ці терміни «зустрілися» в медичній хімії, в тій її області, яка займається хіміотерапією пухлинних, вірусних і мікробних захворювань.

У цій роботі ми будемо оперувати інтеркаляцією у лермановській інтерпретації. Таким чином, мова не йде про зміну ДНК як носія генетичної інформації (мутагенези).

Інтеркаляція – вбудовування плоского хромофора між двома сусідніми парами основ ДНК таким чином, що площина інтеркалятора виявляється перпендикулярною до осі спіралі ДНК. Інтеркаляція супроводжується зміною конформації ДНК (часткове розкручування спіралі, в нативному стані характеризується кроком в 3,4 нм на виток, 10 пар основ) [4]. При розкручуванні спіралі ця відстань збільшується приблизно в 2 рази [5]. Таким

чином, "простір", який звільняється, не перевищує $3,3 \text{ \AA}$ й це накладає обмеження на об'єм заступників, які знаходяться в безпосередній близькості – на 1σ -зв'язок – від фрагмента, що інтеркалірує [6]. Інтеркаляція в лінійні молекули ДНК супроводжується збільшенням контурної довжини і, отже, в'язкості розчину [7], а в разі плазмід – зняттям супервитків, що відбивається у зменшенні електрофоретичної рухливості (при певному навантаженні плазмиди інтеркалятором вона починає набувати зворотного знаку крутіння, а електрофоретична рухливість знову зростає) [8].

Інтеркаляція в більшості випадків підпорядковується принципу виключення найближчих місць зв'язування, згідно з яким ліганди не можуть розташовуватися в сусідніх проміжках між парами [9].

Втрати енергії (порушення стекінг-взаємодії між парами і ентропійні фактори) компенсуються за рахунок вигідних гідрофобних, дисперсійних і електростатичних взаємодій [5] між інтеркалятором і парами, що формують місце зв'язування.

З огляду на те, що найбільша густина негативного заряду ДНК спостерігається у малому жолобі [10] та, з іншого боку, останній являє собою зручний «гідрофобний карман» для бічних ланцюгів [11], в більшості випадків ліганд прагне розташуватися в місці зв'язування таким чином, щоб розмістити гідрофобний основний фрагмент саме там. З іншого боку, на малій відстані між хромофором ліганда, що інтеркалірує, і парами основ, слід зважати на дисперсійні взаємодії між полярними хромофорами інтеркалятору і парами основ. І нарешті, енергія гідрофобних взаємодій між лігандом і місцем зв'язування буде симбатною «площі перекривання» хромофоров інтеркалятору та пар основ. Всі ці міркування наочно демонструють складність всієї сукупності взаємодій, що мають місце при інтеркаляції. Тож не дивно що, не дивлячись на 40-річну історію досліджень інтеркаляції й досі немає чіткого уявлення про структурні вимоги місця зв'язування до ліганду. Іншими словами, структура «ідеального інтеркалятору» ще не є визначеною.

Є загальноприйнятним, що інтеркаляторами можуть бути конденсовані ароматичні або гетероароматичні системи, які містять три і більше конденсованих ядер. З іншого боку, відомо (хоча і невелика кількість) інтеркалятори, які представляють собою конденсовані біцикли [12], однак і в цьому випадку заступники, наявні в хромофорі, повинні бути копланарними площині «основного» хромофору.

Важливе значення для параметрів зв'язування інтеркалятора з ДНК мають спосіб і топологія приєднання бічного ланцюга. Це обумовлено тим, що інтеркалятор, розташований в місці зв'язування з певною орієнтацією щодо пар основ, направляє в малий або великий жолоб ті або інші екзоциклічні фрагменти, і в результаті цього міцність комплексу значною мірою залежить від взаємного розташування бічного ланцюга і неіндиферентних фрагментів нуклеотиду.

Істотну роль при інтеркаляції відіграють замісники у поліциклічному фрагменті. Так, згідно з [13], поліпептидні цикли актиноміцину є відповідальними за його GC-специфічність.

Інтеркалятори можуть зв'язуватися як з дволанцюжковими молекулами ДНК (дуплекс), так і з НК вищих порядків організації – з триплексами і квадруплексами. У першому випадку контурна довжина молекули вздовж її довгої осі не повинна перевищувати максимальної ширини пари основ (9 \AA), що приблизно відповідає чотирьом лінійно анельованим бензольним кільцям, а вздовж малої осі – двом, що відповідає відстані в $5 - 6 \text{ \AA}$. Уведення додаткових (понад 4) ароматичних фрагментів в конденсовану систему таким чином, що молекула набуває бумерангоподібної форми, призводить до появи афінітету до триплексу, а також ліганд не втрачає здатності до зв'язування з дуплексними НК. Вибірковість таких лігандів до мішеней визначається співвідношенням констант асоціації. Подальше збільшення «площі хромофору» або «округлення» топології сполученої системи призводить до появи афінітету до квадруплексів [14].

Для реалізації інтеркаляції пари основ ДНК повинні «розійтися», щоб вивільнити простір, в якому ліганд може розміститися. Така розбіжність реалізується за рахунок змін конформації, відповідає товщині пари, контурна довжина полинуклеотида при інтеркаляції збільшується приблизно в α раз:

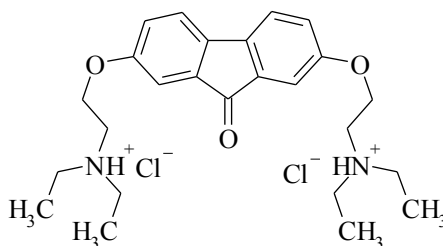
$$\alpha = \frac{n + 1}{n},$$

де n – кількість пар основ, які формують місце зв'язування;

величина $n + 1$ відповідає кількості виключених місць зв'язування.

Спочатку інтеркалятори розглядалися як потенційні протипухлинні препарати [15, 16, 17], що до певної міри породило певний консерватизм у ставленні до них. З іншого боку, лише деякі інтеркалятори досягли рівня клінічного використання в силу достатньо високої токсичності і, найчастіше, через низьку активність, обумовлену "швидкою" кінетикою їх взаємодії з ДНК (останнім часом намітився підхід до подолання цих недоліків). До числа найбільш відомих протипухлинних препаратів-інтеркаляторів слід віднести мітоксантрон, нітракрін і амсакрин.

Похідні 2,7-діоксифлуорен-9-она є цікавим класом органічних сполук. Серед них відомі противірусні та імуностимулюючі препарати [18, 19], в основі дії яких лежить інтеркаляція жорсткої ароматичної трициклічної системи в ДНК [20]. Особливий інтерес представляють біс-(алкіламіноетокси)-похідні 2,7-діоксифлуорен-9-она в зв'язку з тим, що один з представників цього ряду сполук, а саме, дигидрохлорид 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-ону (тилорон) широко відомий в даний час як лікарський препарат нового покоління, зареєстрований під торговою назвою «Аміксин ІС» [21].



Тилорон

Звісно ж, що інтеркаляція лежить в основі противірусної дії і інших похідних акридину, показаного в роботі [22]. Більш того, багато з вивчених сполук виявилися індукторами інтерферону [23]. Показано противірусну активність *in vitro* відповідних біс-похідних [24]. Таким чином, інтеркаляція є ефективним механізмом реалізації протиінфекційної та протипухлинної дії [25].

Взаємодію інтеркалятора з ДНК можна розглядати як двостадійний процес – власне інтеркаляції і взаємодії бічних фрагментів в жолобі (малому або великому, в залежності від топоізомерії).

1.1.2 Люмінесцентні органічні барвники

Флуоресцентний метод аналізу поряд з методом радіоактивного мічення і спектрофотометрією часто використовують для вивчення хімічної структури і фізико-хімічних властивостей нуклеїнових кислот. Ретельне вивчення нуклеїнових кислот та їх роботи з комерційними «малими молекулами» дозволяє вирішувати низку питань медичної хімії, зокрема, створення противірусних лікарських препаратів. Нуклеїнові кислоти володіють власною люмінесценцією [26], але у зв'язку з низькою інтенсивністю її використання для вивчення біологічних властивостей і високочутливого визначення ДНК є обмеженою. Для підвищення чутливості визначення нуклеїнових кислот використовують люмінесцентні зонди: органічні барвники, металокомплексні сполуки, іони лантанідів та їх комплексні сполуки. Дані люмінесцентні зонди, що володіють флуоресценцією, при взаємодії з нуклеїновими кислотами змінюють свої випромінювальні властивості в порівнянні з такими у вільній формі. У зв'язаному стані інтенсивність люмінесценції зондів може бути більшою або меншою, спектри збудження і люмінесценції можуть зсуватися, а ступінь поляризації люмінесценції зазвичай збільшується. Всі ці фактори можуть бути враховані з високим ступенем точності та дають інформацію щодо розмірів і форм ДНК. У таблиці 1.1 представлено люмінесцентні зонди, які найбільш широко застосовуються для визначення ДНК.

Розглядають чотири типи взаємодії люмінесцентних зондів з молекулами ДНК: інтеркаляційні, взаємодія по жолобу, електростатичне і утворення асоціатів на поверхні нуклеїнових кислот [27].

Органічні зонди, як правило, є поліциклічними ароматичними катіонами з планарною структурою і здатними вбудовуватися між парами основ молекул ДНК, що збільшує інтенсивність люмінесценції зонду. Таке збільшення сигналу дозволяє кількісно визначати вміст ДНК в досліджуваному розчині. Найбільш часто в якості інтеркалятора ДНК використовують органічні барвники: етидію бромід (ЕБ) [28], акридіновий помаранчевий (АП) [29], акридіновий жовтий (АЖ) [30].

Таблиця 1.1

Межі виявлення нуклеїнових кислот з використанням органічних флуоресцентних зондів

Флуоресцентні зонди	Нуклеїнова кислота	Межа виявлення (нг/мл)	Література
Етидію бромід	ДНК	10	[28]
PicoGreen	ДНК	0.025	[32]
OliGreen	ДНК	0.1	[33]
RiboGreen	РНК	1	[33]
Діамантовий крезоловий синій	ДНК / РНК	7 / 25	[38]
Нільський блакитний	ДНК / РНК	3 / 27	[39]
Фосфін 3R	ДНК / РНК	6 / 13	[40]
YOYO, TOTO	ДНК	0.5	[35, 36]
Акридіновий помаранчевий	ДНК	23	[29]
Акридіновий жовтий	ДНК	0.023	[30]
Hoehchst 33258	ДНК	10	[31]
Hoehchst 33258 (ПДДА)	ДНК	5	

Вивчено інтеркаляційний і електростатичний механізми взаємодії органічних барвників ЕБ і АП з молекулами ДНК. При інтеркаляції

молекули органічних барвників вбудовуються між парами основ ДНК, в результаті чого спостерігається різке збільшення квантового виходу люмінесценції та батохромний зсув спектру збудження. Електростатичне взаємодія зі спіральними молекулами полінуклеотидів відбувається між катіоном барвника і негативно зарядженими фосфатними групами ДНК.

Високочутливе люмінесцентне визначення ДНК досягнуто шляхом взаємодії: бісімідазольного барвника Hoechst 33258 з ДНК в присутності катіонного поліелектроліту діалілдиметіламонію хлориду (ПДДА) [31]; органічного барвника – PicoGreen [32, 33], який дозволяє знизити межу виявлення ДНК у 400 разів у порівнянні з Hoechst 33258, а також органічних барвників – OliGreen [33] и RiboGreen [26], тіазолового помаранчевого (ТП) [34].

Димерні інтеркалятори представляють собою молекули, що містять в своєму складі дві інтеркаляційні групи, що володіють великим афінітетом до ДНК у порівнянні з моноінтеркаляторами. Найбільш широко використовуються в лабораторній практиці бісінтеркалятори – гомодимери тіазолового оранжевого (ТОТО) і оксазолового жовтого (YOYO) [35, 36], кон'югація яких з ДНК призводить до значного збільшення квантового виходу. Дані барвники мають слабку люмінесценцію у вільному стані і різко її збільшують у результаті приєднання до ДНК (у 1000 разів).

Запропоновано подвійний органічний зонд EB-TaqMan для встановлення специфічності нуклеїнових кислот у гомогенних розчинах з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [37].

Ефект гасіння флуоресценції спостерігається при взаємодії ДНК з діамантовим крезоловим синім (ДКС), нільським блакитним, фосфіном 3R [38- 40].

Широке застосування для визначення ДНК знайшли деякі лікарські препарати, зокрема, хінолони, які мають антибактеріальні властивості і є інгібіторами ДНК. Взаємодія молекул ДНК з хінолонами та їх комплексними сполуками з перехідними металами розглянуто у роботах [41, 42].

1.1.3 Лантанідні люмінесцентні зонди

Поряд з органічними зондами широко застосовуються для визначення ДНК комплексні сполуки іонів перехідних металів: сполуки рутенію з біпіриділом [43], кобальту з 5-(3-флуорен-4-хлорфенилаза)-8-сульфонамідхіноліном (ФХФСХ) [44], цинку з кверцетином [45] та алюмінію з 8-гідроксихіноліном [46]. Також показано можливість застосування для цих цілей комплексних сполук лантану [47] та ітрію [48].

Як люмінесцентні зонди для визначення нуклеїнових кислот найбільш широке застосування знайшли іони Tb(III) [49].

Однак детектування ДНК за допомогою іонів Tb(III) є недостатньо чутливим, тому в останні роки широко використовують комплексні сполуки лантанідів у якості люмінесцентних міток і зондів, загальними вимогами до яких є: високий квантовий вихід люмінесценції, висока кінетична стійкість комплексів, їх розчинність у воді, отримання оптимального аналітичного сигналу при фізіологічному значенні рН.

Як лантанідні люмінесцентні зонди застосовують комплексні сполуки Eu(III) з тетрацикліном (ТС) [50], окситетрацикліном (ОТС) [51], бензоїлацетоном [52] та 2-[(8-гідрокси-5-сульфо-7-хінолін)азо]-1,8-дигідрокси-3,6-нафталін дисульфокислотою (ГХСК) [53]. Збільшення інтенсивності люмінесценції комплексів Eu(III)-ТС і Eu(III)-ОТС при додаванні ДНК, а також збільшення часу життя в потрійних системах Eu(III)-ТС-ДНК і Eu(III)-ОТС-ДНК пояснюється взаємодією іонів європію з фосфатними групами ДНК.

Ефекти сенсibilізації та гасіння люмінесценції у присутності ДНК характерні для комплексних сполук Tb(III) з 1,10-фенантроліном [54], тироном [55], 1,6-біс(1'-феніл-3'-метил-5'-піразолон-4'-)гександіоном – (БФМПГД)-ЦТАБ [56], норфлоксацином [57], дифлоксацином [58], похідними 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти [59,60], еноксацином [61], данофлоксацином [62].

Для вивчення гібридизації нуклеїнових кислот використовують

специфічну реакцію взаємодії між міченим фрагментом ДНК або РНК і нуклеїновою кислотою з комплементарною послідовністю. Даний аналіз є напівкількісним і застосовується для генетичної діагностики, при інфекційних та злоякісних захворюваннях, судової ідентифікації. Можливість синтезу генів з певною послідовністю нуклеотидів дає полімеразна ланцюгова реакція, за допомогою якої є можливою ідентифікація нуклеїнових кислот для діагностичних цілей. Для вивчення гібридизації ДНК і ПЛР застосовують реакції імунофлюоресценції з часовим розділенням, в якому широко використовують комплекси Eu(III) та Tb(III) [63 - 65].

Таблиця 1.2

Межі виявлення нуклеїнових кислот з використанням лантанідних люмінесцентних зондів

Флуоресцентні зонди	Нуклеїнова кислота	Межа виявлення, нг/мл	Литература
Tb ³⁺ -Тирон	ДНК / РНК	1 / 0,6	[55]
Eu ³⁺ -тетрациклін	ДНК	10 / 3	[50]
Tb(III)	РНК	100	[49]
Eu(III)-окситетрациклін	ДНК	11	[51]
Eu(III)-ГХСК	ДНК	12.3	[53]
Tb ³⁺ -1,10-фенантролін	ДНК / РНК	100 / 200	[54]
Eu ³⁺ -бензоілацетон	ДНК	6.0 (пМ)	[52]
Tb ³⁺ -БФМППД-ЦТМАБ	ДНК / РНК	9 / 5	[56]
Tb ³⁺ -норфлоксацин	ДНК / РНК	0,9 / 0,6	[57]
Tb ³⁺ -еноксацин	ДНК	5,0	[61]
Tb ³⁺ -дифлоксацин	ДНК	0,5	[58]
Tb ³⁺ -амід 2-оксо-3-хінолінкарбонової кислоти	ДНК	10,0	[60]
Tb ³⁺ -данофлоксацин	ДНК	8,0	[62]

На закінчення можна констатувати, що в даний час нарівні з

органічними зондами перспективним є використання сенсibilізованої люмінесценції комплексних сполук лантанідів для підвищення чутливості детектування ДНК.

1.2 Дослідження взаємодії молекул лікарських препаратів з білками

1.2.1 Загальна характеристика флуоресценції білків

Молекули білків представляють собою лінійні полімери, що складаються з 20 основних α -L-амінокислот (які є мономерами) і, в деяких випадках, з модифікованих амінокислот.

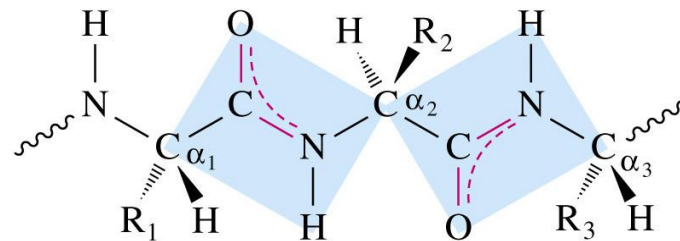


Рисунок 1.3 – Схематичне зображення первинної структури білка

При утворенні білка в результаті взаємодії α -аміногрупи ($-\text{NH}_2$) однієї амінокислоти з α -карбоксильною групою ($-\text{COOH}$) іншої амінокислоти утворюються пептидні зв'язки.

Білки є структурною і функціональною основою життєдіяльності всіх живих організмів, вони забезпечують ріст, розвиток і нормальний перебіг обмінних процесів в організмі. У природі існує приблизно 10^{10} – 10^{12} різних білків, що забезпечують життєдіяльність організмів всіх ступенів складності від вірусів до людини. Білками є ферменти, антитіла, більшість гормонів. Необхідність постійного оновлення білків лежить в основі обміну речовин. Альбумін є одним з найважливіших компонентів сироватки крові, що переважає серед сироваткових білків за кількісним вмістом. Завдяки здатності оборотно зв'язувати різні низькомолекулярні речовини екзогенного та ендogenous походження (ліки, отрути, продукти метаболізму і т. п.), альбумін здійснює їх транспортування до різних органів і тканин організму

[66]. При цьому ступінь навантаженості альбуміну низькомолекулярними лігандами знаходиться у прямій відповідності зі ступенем інтоксикації організму [67].

Альбумін відноситься до одного з найбільш вивчених білків організму. У даний час повністю розшифрована амінокислотна послідовність молекули та її просторова структура, охарактеризовані основні центри зв'язування лігандів. Встановлено, що зв'язування з активними центрами альбуміну носить неспецифічний характер і здійснюється за рахунок різних типів взаємодій: гідрофобних, дипольних, електростатичних, за допомогою Ван-дер-Ваальсових сил, водневих зв'язків та ін. Утворені при цьому комплекси є неміцними, легко дисоціюють; величина енергії зв'язку не перевищує 8 – 10 ккал/моль. У молекулі альбуміну міститься велика кількість реакційно здатних ділянок (тіолові, імідазольні, карбоксильні групи, аміногрупи лізину), завдяки чому він легко вступає у взаємодію з різними іонами, продуктами обміну і лікарськими препаратами (ЛП), переважно слабокислого та нейтрального характеру. Ступінь та інтенсивність зв'язування істотно впливають на фармакокінетичні, фармакодинамічні і токсичні властивості ЛЗ, тканинне зв'язування, тривалість дії ЛП, концентрацію в біологічних рідинах і на рецепторній ділянці, а в кінцевому рахунку – на характер фармакологічної дії й терапевтичний ефект.

Лікарська речовина зазвичай складається з: а) специфічного полярного фрагменту, що дозволяє лікам розчинятися в крові і у водній фазі клітин; цей фрагмент відповідальний за контакти з рецепторами; б) неполярного фрагменту, що дозволяє лікам успішно переходити з водної фази у клітинні структури. Оптичні характеристики ліків пов'язані з кількістю і локалізацією в них полярних і неполярних фрагментів. Ці фрагменти обумовлюють здатність гасити флуоресценцію. Тому має місце кореляція між фармакологічною активністю та флуоресцентними параметрами. Вимірювання залежності інтенсивності флуоресценції зонду від концентрації гасників дозволяє знаходити константу зв'язування ліків з мембраною.

Гасіння флуоресценції зонду може бути пов'язаним також з його витісненням з гідрофобного «карману» (в білку, ДНК або ліпідному бішарі). На підставі проведених досліджень запропоновано надійний експрес-метод первинного флуоресцентного скринінгу *in vitro* потенційних ліків. Він ґрунтується на вимірюванні гасіння випробуваними органічними речовинами флуоресценції біополімерів і зондів [68].

Більшість молекул біологічних речовин (наприклад, білки) є природними флуорофорами, тобто речовинами, здатними флуоресціювати в певному діапазоні довжин хвиль за відповідних умов збудження. Встановлено, що флуоресценцію білків забезпечують ароматичні амінокислоти, що володіють системою спряжених зв'язків. Основним флуоресціюючим компонентом є триптофан, який обумовлює близько 90% всієї білкової флуоресценції. Спектр флуоресценції триптофану у водному розчині являє собою широку безструктурну смугу з максимумом при 348 нм і напівшириною в 60 нм, а його форма та положення максимуму визначаються переважно індольним кільцем молекули. Індол, триптофан та їх похідні є дуже чутливими до полярності розчинника та схильними до загальних і специфічних взаємодій з розчинником, завдяки чому спектр випромінювання триптофанових залишків може відображати полярність їх найближчого оточення. На спектри випромінювання білків впливають зв'язування субстратів, реакції асоціації і денатурації [69]. Вимірювання поляризації флуоресценції відображає середній час релаксації триптофанових залишків, незважаючи на експериментальні труднощі, викликані складністю їх поляризаційного спектру. Отже, шляхом вимірювання поляризації можна виявляти вплив денатурантів на структуру білка, реакції асоціації білків з лігандами та іншими макромолекулами. Істотним є те, що триптофан виявляється унікально чутливим до гасіння різними речовинами [70]. Флуоресценцію триптофану гасять не тільки кисень і йодид-іони, а й акриламід, сукцинімід, пероксид водню, діхлорацетамід, піридин гідрохлорид, цистеїн, хлоровані вуглеводні, NO_3^- ,

IO_3^- , Cs^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} та Mn^{2+} . Ця чутливість до різного роду гасників обумовлено схильністю збудженого індольного ядра донірувати електрони під час перебування у збудженому стані. Чутливість до гасників дозволяє визначати доступність триптофанових залишків у білках методом гасіння.

Детальний аналіз флуоресценції білків ускладнюється як великою кількістю чинників, які впливають на емісію індольної складової, так і наявністю у більшості білків декількох різних триптофанових залишків. Оскільки кожен залишок знаходиться в різному оточенні, то і спектральні властивості кожного залишку в загальному випадку розрізняються. Випромінювання всіх залишків перекриваються в усьому використовуваному діапазоні довжин хвиль, і досить складно розділити спектральні внески кожного з них у багатотриптофановому білку. Крім того, спектри випромінювання і кінетика гасіння інтенсивності флуоресценції є досить складними, як для вільного триптофану, так і для білків, які містять єдиний триптофановий залишок. Наприклад, для більшості білків з єдиним триптофановим залишком не спостерігається єдиного часу гасіння флуоресценції. З цієї причини не можна просто інтерпретувати багатоекспоненціальну кінетику гасіння в термінах поведінки індивідуальних залишків у багатотриптофанових білках. Детальний огляд даних з флуоресценції амінокислот і білків зроблено декількома авторами. Більш детальну інформацію можна знайти в роботах [71, 72].

Білки містять три амінокислотних залишки, які можуть давати внесок в ультрафіолетову флуоресценцію: тирозин (Tyr), триптофан (Trp) і фенілаланін (Phe). Спектри поглинання цих амінокислот наведено на рисунку 1.4. Флуоресценція білків зазвичай збуджується в максимумі поглинання у 280 нм або при більших довжинах хвиль. Отже, фенілаланін не збуджується в більшості експериментальних випадків. Більш того, квантовий вихід фенілаланіну в білках є малим, так що випромінювання цього залишку спостерігається рідко. Поглинання білків за 283 нм пов'язано з тирозиновим та триптофановим залишками. За довжини хвиль > 295 нм поглинає

головним чином триптофан [73]. Тому передбачається, що його флуоресценція може бути селективно збудженою в діапазоні 295 – 305 нм, що і було доведено експериментально.

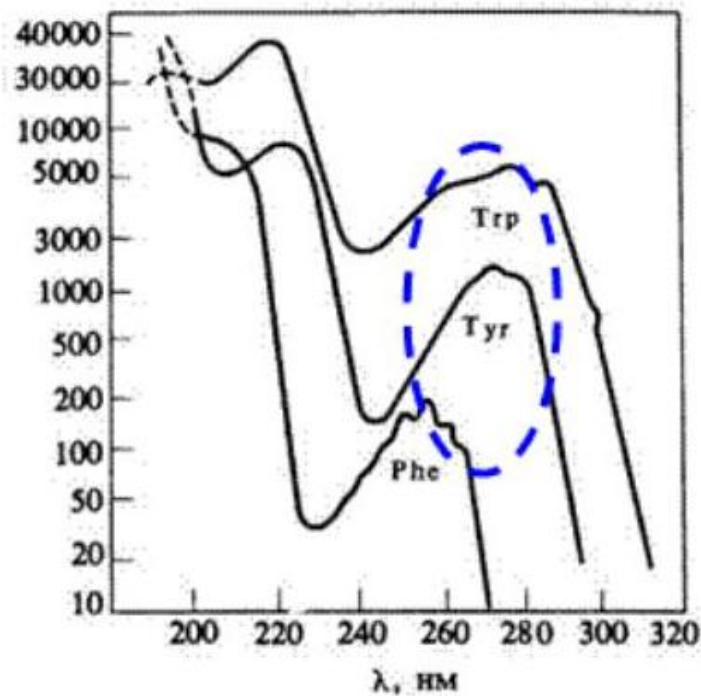


Рисунок 1.4 – Спектри поглинання ароматичних амінокислот

Флуоресцентні спектри випромінювання ароматичних амінокислот приведені на рисунку 1.5. Випромінювання водного розчину тирозину в воді відбувається за 303 нм і є порівняно невідчутним до полярності розчинника. Максимум випромінювання триптофану у воді знаходиться при 348 нм і сильно залежить від полярності середовища. Тирозинові залишки можуть зазнавати іонізації в збудженому стані, що призводить до втрати протона ароматичною гідроксильною групою. В основному стані для цього гідроксилу $pK \approx 10$, а в збудженому стані pK зменшується до ~ 4 . Гідроксильна група може дисоціювати протягом часу життя збудженого стану, що призводить до гасіння флуоресценції тирозину.

При збудженні в області 280 нм у випромінюванні більшості нативних білків переважає флуоресценція триптофану. Незважаючи на відносно велику кількість тирозинових залишків, спектр випромінювання САЛ – спектр головним чином триптофану. Відсутність тирозинового

випромінювання у більшості білків залежить від їх тримірної структури. Денатурація білків призводить до збільшення випромінювання тирозинів, але їхній вклад є зазвичай невеликим [74].

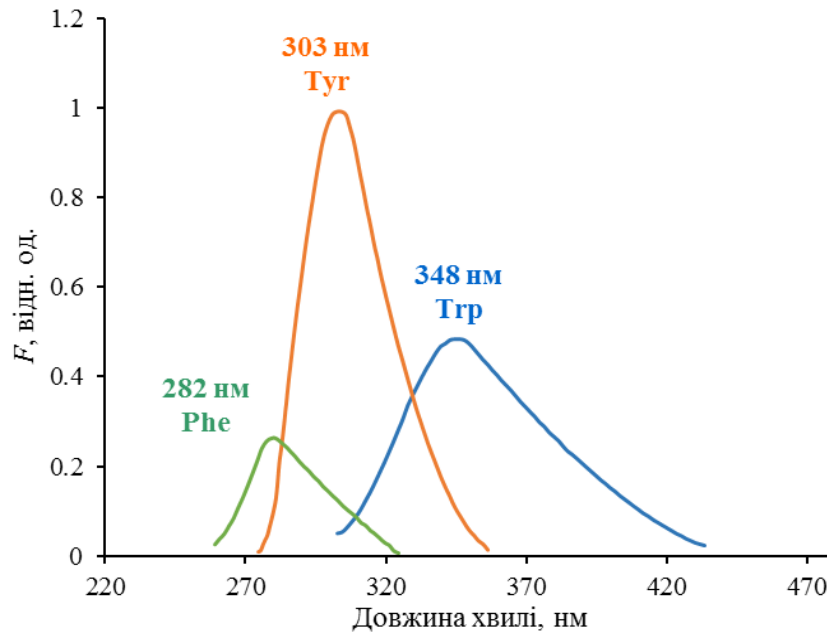


Рисунок 1.5 – Спектри флуоресценції ароматичних амінокислот

Флуоресценцію білків, які не містять залишків триптофану, але мають в своєму складі фенілаланін і тирозин, обумовлено тільки залишками тирозину, який також є природним флуорофором і має максимум спектра флуоресценції при 303 – 304 нм, а його інтенсивність є на порядок нижчою, ніж у триптофану. На положення максимуму флуоресценції тирозину, на відміну від триптофану, не впливають конформаційні перебудови макромолекули. Тирозин інтенсивно флуоресціює в розчині і при денатурації білків, зберігаючи положення максимуму. Його включення до складу білка супроводжується лише ефектом гасіння флуоресценції і падінням квантового виходу. Світіння фенілаланіну можна спостерігати тільки у тих небагатьох білків, які не містять інших ароматичних амінокислот – триптофану і тирозину (наприклад, преальбумін м'язів риби, гепатокупреїн коня, рибосомальний білок). Спектр флуоресценції фенілаланіну має максимум при 282 нм і його квантовий вихід є на порядок нижчим, ніж у тирозину.

Але якщо до складу білка входять всі три амінокислоти, то в спектрі флуоресценції проявляється тільки один триптофановий максимум. За довжини хвилі збудження 275 нм спостерігається випромінювання і тирозину, і триптофану. При збудженні з $\lambda = 295$ нм спостерігається тільки емісія триптофану, тому таке збудження корисно вибирати в тих випадках, коли бажано виключити емісію, пов'язану з тирозином.

Відомо, що розвиток патологічних процесів викликають в плазмі і сироватці крові цілу низку відхилень від норми. Це відноситься як до кількісного, так іноді і до якісного складу плазмових білків, гормонів і т. ін. Крім того, така біологічна рідина, як кров, є дуже зручним об'єктом для вивчення флуоресцентними методами. Специфічні зміни параметрів флуоресценції сироватки крові були виявлені при різних захворюваннях. При ревматоїдному артриті ступінь власної флуоресценції сироватки крові зменшувалася в порівнянні з флуоресценцією в осіб контрольної групи. Вивчення спектрів флуоресценції синовіальної рідини хворих артритом показало, що за деякими її параметрами можна диференціювати різні стадії цього захворювання [75]. Аналіз параметрів власної флуоресценції триптофану дозволяє досліджувати конформаційні зміни у третинній структурі молекул різних сполук, наприклад, конформаційні зміни міоглобіну. Флуоресцентні методи дозволяють також дослідити вплив різних дій (лазерне випромінювання, температура, ультразвук і т.ін.) на стан білків.

Дослідження власної флуоресценції біологічних матеріалів не завжди дозволяє отримати бажану інформацію про об'єкт. В такому випадку використовують штучні флуорофори, тобто спеціально синтезовані речовини, що мають специфічний спектр флуоресценції або у вільному стані, або при зв'язуванні з тим чи іншим об'єктом дослідження. Флуоресценція таких речовин (зондів), як правило, має високий квантовий вихід і досить великий час життя.

За допомогою флуоресцентних зондів можна досліджувати молекулярні механізми виникнення і розвитку патологічних процесів, дію на організм

біологічно активних речовин і лікарських препаратів. Флуоресцентні зонди застосовуються також для діагностики і прогнозу розвитку захворювань, виявлення факторів ризику і контролю ефективності лікування. Зондова флуоресценція чутлива до структурно-функціональних змін в біологічних мембранах, мікров'язкості її ліпідного бішару, зв'язування з білками та іншими речовинами, структурним перебудовам в білках, зміни мембранного потенціалу, концентрації внутрішньоклітинного кальцію та ін. Аналізуючи спектр флуоресценції клітин і мембран, пов'язаних із зондом, можна визначити полярність мікрооточення флуорофора. Інтенсивність і тривалість життя флуоресценції зонда характеризують рухливість сольватної оболонки, поляризація флуоресценції – обертальний рух, орієнтацію і в'язкість мікрооточення зонда. Гасіння флуоресценції зонда сторонніми речовинами дозволяє встановити доступність флуорофора для гасників, його локалізацію у білках і мембранах клітин та їх проникність для гасників, швидкість дифузії. За переносом енергії збудження з мембранних білків на флуоресцентний зонд і по мірі ексімеризації зонда можна визначити відстань між флуорофорами і в'язкість середовища, що оточує зонд [76].

Таким чином, дослідження флуоресценції різних біологічних рідин здатне дати інформацію про стан функціонально важливих сполук, клітин і мембран. Більш широке застосування флуоресцентних зондів у медицині дозволяє з'ясувати молекулярні механізми патогенезу захворювань, а також використовувати параметри як власної, так і зондової флуоресценції в якості додаткових діагностичних тестів.

1.2.2 Гасіння флуоресценції

Гасінням флуоресценції називають будь-які процеси, які зменшують інтенсивність флуоресценції даної речовини. До гасіння може призводити безліч процесів, в тому числі реакції в збудженому стані, перенесення енергії, утворення комплексів і гасіння при зіткненнях. Гасіння флуоресценції широко вивчено як в теоретичному аспекті, так і в додатку

флуоресценції до біохімічних проблем, причому додатки пов'язані з властивостями процесу гасіння [77]. Для гасіння (як статичного, так і динамічного) потрібен контакт між молекулами флуорофора і гасника. У разі *динамічного гасіння* гасник повинен дифундувати до флуорофору протягом часу перебування в збудженому стані. В результаті контакту флуорофор повертається в основний стан без випромінювання фотона. У разі *статичного гасіння* між флуорофором та гасником (в основному стані, до поглинання збуджуючого флуоресценцію фотона) утворюється комплекс, що не флуоресцює. У будь-якому випадку, щоб відбулося гасіння, флуорофор і гасник повинні контактувати. Це – основна вимога, яка проявляється в різних додатках гасіння. Наприклад, виміром гасіння можна виявити доступність флуорофорів для гасників. Якщо даний розчинник є дуже в'язким, то дифузія сповільнюється і гасіння слабшає. Отже, вивчивши гасіння, можна визначити швидкості дифузії гасників. Припустимо, флуорофор пов'язаний або з білком, або з мембраною. Якщо білок або мембрана є непроникними для гасника, і флуорофор локалізований всередині макромолекули, то не може бути а ні динамічного, а ні статичного гасіння. Виходячи з цих міркувань, гасіння можна використовувати для з'ясування локалізації флуорофорів у білках і мембранах та їх проникності для гасників.

Через те, що багато речовин можуть діяти як гасники, часто можна легко підібрати комбінацію “флуорофор – гасник” для вирішення поставленого завдання. Важливо відзначити, що не всі флуорофори гасяться будь-якими речовинами. Цей факт іноді можна використовувати для селективного гасіння певного флуорофору. Ефект гасіння залежить від його механізму, обумовленого структурою індивідуальних молекул. Детальний аналіз механізму гасіння є складним.

Динамічне гасіння флуоресценції описується рівнянням Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q], \quad (1.1)$$

де:

F_0 та F – інтенсивності флуоресценції у відсутності та в присутності гасників відповідно;

k_q – бімолекулярна константа швидкості гасіння;

τ_0 – час гасіння флуоресценції у відсутність гасників;

$[Q]$ – концентрація гасника;

$K_{SV} = k_q \cdot \tau_0$ – штерн-фольмеровська константа гасіння.

Дані з гасіння зазвичай представляють у координатах F_0/F як функція $[Q]$, оскільки F_0/F , як очікується, має лінійно залежати від концентрації гасників. Графік відсікає на осі ординат відрізок, який дорівнює одиниці, і тангенс кута нахилу рівний K_{SV} . Корисно відзначити, що K_{SV}^{-1} дорівнює концентрації гасників, при якій $F_0/F = 2$, тобто гаситься 50% інтенсивності флуоресценції. Прямолінійна залежність в координатах Штерна-Фольмера зазвичай вказує на існування в розчині одного типу флуорофорів, однаково доступних для гасника. Якщо присутні два типи флуорофорів, і один з них недоступний для гасника, то штерн-фольмеровській графік відхиляється від лінійності у біг осі абсцис. Таке відхилення часто зустрічається при гасінні флуоресценції триптофану в білках полярними або зарядженими гасниками. Ці молекули важко проникають усередину гідрофобних білків і гасять тільки залишки триптофану на поверхні білка.

Важливо знати, що лінійність, яка спостерігається в координатах Штерна-Фольмера, ще не доводить динамічний характер гасіння флуоресценції. Статичне гасіння також дає пряму лінію в координатах Штерна-Фольмера. У загальному випадку розрізнити статичне і динамічне гасіння можна за їхню залежністю від температури і в'язкості або за вимірюванням часу згасання флуоресценції, що є важливішим.

Важлива характеристика динамічного гасіння полягає в однаковому зменшенні інтенсивності і часу згасіння флуоресценції:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} . \quad (1.2)$$

Зменшення часу згасання відбувається через те, що гасіння являє собою додатковий конкуруючий процес, що дезактивує збуджений стан без випромінювання флуоресценції, що призводить до зменшення квантового виходу.

Гасіння може також відбуватися в результаті утворення комплексу, що не флуоресціює в основному стані, між флуорофором і гасником. Як тільки відбулося поглинання світла, комплекс негайно повертається в основний стан без випромінювання фотона.

Залежність F_0/F від $[Q]$, у випадку статичного гасіння, є ідентичною залежності, одержуваної для динамічного гасіння, за винятком того, що константа швидкості гасіння тут замінюється на константу асоціації (K_A):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A \cdot [Q] . \quad (1.3)$$

Дані з гасіння флуоресценції, отримані з вимірів інтенсивності у разі, якщо немає додаткової інформації, можна пояснити або динамічними, або статичними процесами. Вимірювання часу гасіння флуоресценції є найбільш чітким методом для розрізнення статичного і динамічного гасіння. Через статичне гасіння частина флуорофорів не спостерігається. Пов'язані в комплекс флуорофори не флуоресціюють і спостерігається флуоресценція тільки незв'язаних флуорофорів. Не зв'язана в комплекс частина флуорофорів є незбудженою, і отже, для неї час гасіння дорівнює τ . Таким чином, для статичного гасіння

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 , \quad (1.4)$$

в той час як для динамічного гасіння час гасіння визначається за формулою (1.2).

Порівняння статичного і динамічного гасіння.

Відмінність статичного гасіння від динамічного часто може бути встановлен не тільки виміром часів гасіння, але і шляхом розгляду інших факторів. Динамічне гасіння залежить від дифузії. Оскільки підвищення температури призводить до збільшення коефіцієнтів дифузії, можна очікувати, що бімолекулярна константа швидкості гасіння буде зростати зі збільшенням температури. Навпаки, при зростанні температури, швидше за все, зменшується стабільність комплексів і тим самим значення констант статичного гасіння [77].

Ще одним додатковим методом для встановлення відмінності статичного гасіння від динамічного може служити ретельний аналіз спектра поглинання флуорофора. Динамічне гасіння впливає тільки на збуджені стани флуорофорів, і можна вважати, що воно не змінюватиме спектрів поглинання. На противагу цьому, утворення комплексу в основному стані часто призводить до зміни спектра поглинання флуорофора.

Змішане динамічне і статичне гасіння

У багатьох випадках випромінювання флуорофора може бути погашено за рахунок як зіткнень, так і утворення комплексу з гасником. Характерна особливістю графіку Штерна-Фольмера в таких випадках є відхилення вгору і увігнутість по відношенню до осі ординат. Залишкова флуоресценція (F_0/F) визначається добутком частки, не пов'язаної в комплекс (F), та частки, не погашеної дифузійними зіткненнями.

Модифікована форма рівняння Штерна-Фольмера є рівнянням другого порядку відносно $[Q]$, що пояснює вигин графіка догори, спостережуваний, коли флуорофор одночасно гаситься як за статичним, так і за динамічним механізмом:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} \cdot [Q]) \cdot (1 + K_A \cdot [Q]) ,$$

$$\frac{F_0}{F} - 1 = (K_{SV} + K_A) \cdot [Q] + K_{SV} \cdot K_A \cdot [Q]^2 .$$
(1.5)

Частку динамічного гасіння в спостережуваному зменшенні

флуоресценції можна визначити зі зміною часів згасання, тобто за залежністю:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{sv} \cdot [Q] . \quad (1.6)$$

Гасіння люмінесценції сторонніми поглинаючими речовинами може також здійснюватися за рахунок безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження (Fluorescence (Förster) Resonance Energy Transfer, FRET) [78] від люмінесцируючої речовини (донора) до гасника (акцептора). При цьому міграція енергії буде тим значнішою, чим сильніше перекриваються між собою спектри флуоресценції донора зі спектрами поглинання гасника. У тих випадках, коли акцептори володіють люмінесцентною здатністю, в результаті міграції на них енергії збудження виникає їх *сенсibilізована люмінесценція*.

Перенесення енергії електронного збудження в рідких і твердих тілах становить одну з фундаментальних проблем фізики конденсованого стану [79, 80] і широко досліджується в даний час. Квантово-механічну теорію переносу енергії в конденсованих середовищах було розроблено Т. Фьорстером [81]. В її основі лежить припущення про те, що перенесення енергії обумовлене слабкою диполь-дипольною взаємодією між донором і акцептором. Пізніше теорію Фьорстера було узагальнено Д. Декстером на випадок мультипольних і обмінних взаємодій [82]. Характерним прикладом передачі енергії за рахунок обмінних взаємодій є міжмолекулярне триплет-триплетне перенесення енергії, наслідком якого є сенсibilізована фосфоресценція [83].

Константа швидкості перенесення енергії (k_T) від специфічного донора (D) до специфічного акцептора (A) визначається виразом:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 , \quad (1.7)$$

де:

τ_D – час життя збудженого стану донора під час відсутності акцептора;

r – відстань між донором і акцептором;

R_0 – характеристична відстань, зване фьорстерівським радіусом, при якому ефективність перенесення становить 50%.

Така залежність швидкості перенесення від відстані призвела до численних застосувань перенесення енергії в біохімічних дослідженнях, особливо тому, що фьорстерівський радіус знаходиться в межах 10 – 100 Å та є порівняним з діаметром більшості молекул білків і товщиною біологічних мембран. Будь-які явища, які впливають на відстань $D - A$, впливатимуть на швидкість перенесення енергії, що дозволяє їх кількісно охарактеризувати. Наприклад, вимірювання перенесення енергії було використано для оцінки відстані між сполучними центрами білків, відстані між хромофорними групами білків та іншими, пов'язаними з мембранами хромофорами, латеральної асоціації мембранних компонентів, реакцій асоціації між макромолекулами.

Новий цікавий додаток до методу FRET – визначення статичних та динамічних конформаційних властивостей макромолекул в розчині. При детальному аналізі кінетики гасіння флуоресценції донора можна визначити розподіл відстаней між парами $D - A$ і швидкість, з якою донор і акцептор дифундують один відносно одного. За допомогою таких вимірювань можна виявляти деталі структурної гетерогенності макромолекул і структурні флуктуації цих молекул на порівняно великих відстанях (~ 40 Å).

Для реалізації FRET між донором і акцептором в розчині необхідно виконання як мінімум двох основних умов. По-перше, відстань між D та A має бути близько 1 – 10 нм. Зазвичай такі відстані досягаються при досить великих концентраціях барвників, що є небажаним у біологічних і клінічних застосуваннях. Використання міцел ПАР в якості своєрідних нанорозмірних «контейнерів», що солюбілізують кілька флуорофорів, дозволяє працювати з низькими вихідними концентраціями барвників (близько 10^{-5} моль/л) і при цьому забезпечує одну з головних умов для безвипромінювального перенесення енергії. Друга необхідна умова: спектр поглинання акцептора

має перекриватися зі спектром флуоресценції донора. При реалізації FRET вимірюють зміни в емісії донора або акцептора, або ті та інші одночасно.

Широке застосування FRET знаходить для вивчення структури і конформації білків [84], гібридизації ДНК [85], рецептор/лігандної взаємодії, мембранної дифузії та транспорту ліпідів [86], в імунному аналізі [87] тощо.

1.2.3 Оцінка параметрів зв'язування з білками різних «малих» молекул

Дослідження взаємодії молекул лікарських засобів з різними білками є важливим для цілей біохімії та медицини. Характер і величина цих взаємодій впливають на біобезпеку, швидкість доставки, фармакологічну реакцію, терапевтичну ефективність та дизайн ліків. Тому дослідження цих взаємодій допомагають зрозуміти структурні особливості, необхідні для біоафінності різних ліків, їх зв'язок з фармакологічною активністю [88]. Люмінесцентний аналіз широко застосовується для встановлення взаємодії «малих» молекул (в тому числі ксенобіотиків, лікарських препаратів (ЛП)) з протеїнами (найчастіше з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) або сироватковим альбуміном людини (САЛ)) [89, 90].

При вивченні взаємодії між білком і лікарською речовиною *in vitro* в якості моделі використовують сироватковий альбумін людини (САЛ) [91]. Він являє собою поліпептидний ланцюг, що складається з 585 амінокислотних залишків і має М.м. 66,5 кДа [92, 93]. Кристалографічний аналіз САЛ та його рекомбінантних форм показав, що поліпептидний ланцюг утворює асиметричну глобулу в формі серця з розмірами приблизно $80 \times 80 \times 30 \text{ \AA}$, на 67% спиралізовану в α -спіраль (рис. 1). Рентгеноструктурний аналіз показав, що білок складається з трьох схожих доменів (I–III), кожен з яких включає по два субдомени (А і В). Субдомен А утворений шістьма, а субдомен В – чотирма α -спіралями, пов'язаними в гнучкі петлі [94]. Усі цистеїнові залишки (крім Цис-34) пов'язані дисульфідними зв'язками. Незважаючи на різноманіття речовин, що вони переносять, існує обмежене

число типів місць зв'язування на молекулі альбуміну, в ідентифікації яких основоположною вважається робота G. Sudlow і співавторів [95]. Досліджуючи витиснення специфічних флуоресцентних маркерів із зв'язуванням з альбуміном, автори відокремили 2 центри зв'язування лігандів на молекулі білка, які згодом отримали назву центрів (ділянок) I і II по Sudlow (рисунок 1.5).

На рисунку позначено поділ альбуміну на домени (I–III) і субдомени (A і B), а також приблизну локалізація центрів I і II по Sudlow. Кристалографічний аналіз комплексів альбуміну з різними лікарськими речовинами і ендогенними сполуками дозволив встановити структуру обох зв'язуючих центрів і виявити амінокислотні залишки в молекулі білка, що відіграють ключову роль в процесі зв'язування лігандів [96].

В огляді [97] обговорюються нещодавні результати, що стосуються природи сайтів зв'язування альбуміну з лікарськими засобами.

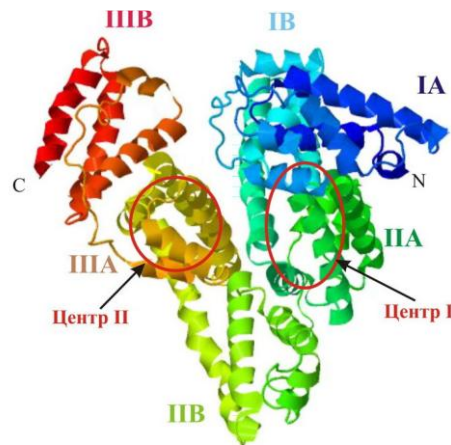


Рисунок 1.5 – Структура сироваткового альбуміну людини

Взаємодія ліків з альбуміном переважно відбувається в одному або двох конкретних сайтах зв'язування. Характер цих сайтів зв'язування з лікарськими засобами було в основному досліджено щодо місця розташування, розміру, заряду, гідрофобності. Такі результати можуть бути корисними інструментами для аналізу взаємодії лікарських засобів і білка в клінічній практиці.

Завдяки присутності в складі САЛ залишку триптофану, який характеризується високою чутливістю до оточення, САЛ може бути використано для вивчення змін в спектрах власної флуоресценції, що відбуваються внаслідок змін конформаційних станів білка при зв'язуванні з субстратами [98].

Флуоресцентна спектроскопія допомагає встановити зв'язування «малих» молекул (лікарських речовин) з білками [99, 100].

Про можливість віднесення цього розділу науки до аналітичної хімії свідчать численні публікації у відповідних журналах. Є низки повідомлень, присвячених детальному вивченню зв'язування метаболітів, ліків, барвників, жирних кислот, біоактивних речовин з протеїнами. Вони свідчать про те, що ліганди відрізняються природою зв'язування з білками [101-168].

Таблиця 1.3

Порівняльна оцінка параметрів зв'язування з білками різних малих молекул

Малі молекули	Білок	K_A (л моль ⁻¹)	J (см ³ л моль ⁻¹)	R_0 (нм)	r (нм)	Лит.
1	2	3	4	5	6	7
карбамазепін	БСА	1.80×10^4	3.24×10^{-15}	2.11	3.60	[102]
індометацин	БСА	8.40×10^5	7.91×10^{-15}	2.36	2.76	[104]
індометацин	САЛ	5.55×10^4	3.06×10^{-15}	2.05	2.47	[105]
мітоксантрон	САЛ	1.56×10^5	1.67×10^{-15}	0.48	2.64	[106]
імідаклоприд	САЛ	1.51×10^4	3.17×10^{-15}	1.52	2.10	[107]
каптопріл	САЛ	1.38×10^5	1.09×10^{-18}	2.37	1.05	[108]
мідазолам (БД)	САЛ	3.90×10^3	1.09×10^{-15}	1.69	2.31	[109]
флавоноїд (евпаторін)	БСА	1.68×10^6	1.79×10^{-14}	1.56	1.64	[110]
3-піразоліл-2- піразолін похідне	БСА	4.47×10^6	-	1.60	2.00	[111]
імідазол похідне	БСА	4.50×10^4	2.37×10^{-15}	2.41	2.44	[112]
Ерлотинубу гідрохлорид	БСА	2.99×10^4	3.89×10^{-21}	2.00	2.20	[113]
сангвінарин	БСА	9.75×10^4	1.29×10^{-14}	2.63	2.38	[114]
нарингін	БСА	1.47×10^4	3.24×10^{-15}	2.32	3.25	[115]
3-карбоксі феноксатиїн	БСА	9.20×10^5	1.63×10^{-15}	1.86	1.86	[116]
паклобутразол	САЛ	2.37×10^5	1.35×10^{-14}	2.58	4.41	[117]

1	2	3	4	5	6	7
пазуфлоксацину мезилат	БСА	1.27×10^5	9.93×10^{-15}	2.45	4.04	[118]
бензидин	трипсин	7.20×10^4	3.92×10^{-15}	2.67	2.97	[119]
неваденсин	лізоцим	5.63×10^5	8.17×10^{-15}	2.41	2.28	[120]
фосфоміцин	БСА	4.71×10^3	1.87×10^{-14}	2.83	4.99	[121]
сульфаметоксазол	САЛ	2.25×10^4	1.70×10^{-16}	2.79	3.89	[122]
мангіферин	БСА	2.82×10^5	3.54×10^{-14}	5.20	5.20	[123]
Tm(III)-порфірин	БСА	5.57×10^5	3.36×10^{-14}	4.53	4.36	[124]
морин	БСА	-	1.91×10^{-14}	2.73	3.06	[125]
фаррерол	лізоцим	6.55×10^6	5.19×10^{-14}	2.07	2.67	[126]
рибофлавін	БСА	7.80×10^4	1.74×10^{-14}	4.12	5.74	[127]
похідне піримідину	БСА	2.45×10^4	9.14×10^{-16}	1.71	2.59	[128]
диклофенак натрію	САЛ	4.25×10^4	3.70×10^{-14}	3.10	2.98	[129]
фуросемід	САЛ	3.76×10^4	1.08×10^{-13}	3.70	3.52	[129]
дексаметазон	САЛ	2.81×10^4	2.25×10^{-13}	4.20	5.30	[129]
цефазолін	САЛ	5.23×10^3	4.48×10^{-15}	2.41	-	[130]
цефтриаксон	САЛ	9.70×10^4	6.21×10^{-16}	1.40	-	[130]
пемфлоксацину мезилат	САЛ	7.04×10^4	6.15×10^{-15}	2.27	2.83	[131]
валсартан	САЛ	7.59×10^2	2.02×10^{-14}	1.79	1.99	[132]
клоназепам (БД)	БСА		7.52×10^{-15}	2.28	3.20	[133]
лорезепам (БД)	БСА	3.06×10^3	3.57×10^{-16}	4.57	5.54	[134]
оксазепам (БД)	БСА	1.63×10^5	7.55×10^{-16}	5.18	6.34	[134]
бромазепам (БД)	БСА	4.68×10^3	6.12×10^{-16}	5.08	6.87	[134]
прулифлоксацин	трипсин	2.48×10^8	9.05×10^{-17}	1.12	0.84	[135]
дифацинон	САЛ	2.85×10^5	-	2.53	2.92	[136]
аспірин	БСА	1.0×10^3	1.98×10^{-13}	1/87	3/71	[142]
моксифлоксацину гідрохлорид (Авелокс)	БСА	5.89×10^4	1.07×10^{-14}	2.48	2.90	[143]
цефминокс	БСА	1.49×10^5	1.70×10^{-17}	0.85	1.09	[155]
цефалексин	БСА	5.45×10^3	1.97×10^{-15}	0.70	1.16	[156]
циклофосфамід	лізоцим	-	1.21×10^{-14}	2.53	2.67	[157]
эфонідипін гідрохлорид	БСА	5.58×10^4	2.32×10^{-15}	2.00	2.30	[158]
фелодипін	БСА	3.31×10^2	5.25×10^{-14}	3.60	4.90	[159]
тіопентал натрію	САЛ	2.50×10^3	2.30×10^{-15}	1.92	2.32	[160]
іміпенем	САЛ	9.43×10^4	8.47×10^{-14}	3.23	4.32	[160]
нарингін пальмітат	БСА	2.79×10^3	1.20×10^{-14}	2.63	3.81	[162]

1	2	3	4	5	6	7
дарунавір	БСА	1.26×10^4	4.25×10^{-15}	2.13	3.13	[163]
дипрофілін	лизозим	8.61×10^4	1.07×10^{-15}	1.72	2.25	[164]
оксиметолон	САЛ	2.39×10^5	2.08×10^{-28}	1.32	1.67	[165]
гефітиніб	БСА	8.32×10^4	3.17×10^{-15}	2.02	2.94	[166]
лапатиніб	БСА	2.24×10^5	1.02×10^{-15}	1.68	2.24	[166]
сунитиніб	БСА	1.32×10^5	2.46×10^{-15}	1.94	2.69	[166]
раміприл	БСА	4.66×10^4	9.92×10^{-15}	2.42	3.56	[167]
аторвастатин	БСА	5.55×10^5	1.03×10^{-15}	1.67	1.99	[168]

В останні роки в результаті інтенсивних досліджень структури і функції альбуміну досягнуто великих успіхів в розшифровці молекулярної структури білка, його просторової організації, розкриті механізмів взаємодії з лігандами, ідентифікації зв'язуючих центрів, а також встановлено низку інших фактів, що мають фундаментальне і прикладне значення. Разом з тим, не можна сказати, що в області дослідження альбуміну всі проблеми вирішено. Треба відзначити наступне: подальше вивчення взаємодії лігандів з альбуміном, включаючи механізми регуляції, роль конформаційних перебудов, а також дослідження нових типів взаємодій є надзвичайно значущою в практичному відношенні для аналізу лікарських взаємодій. Дослідження доставки ліків в тканини є вкрай важливим, зокрема, при створенні нових лікарських препаратів з оптимальними параметрами розподілу.

1.3 Висновки до розділу 1

Систематизовано та проаналізовано літературні дані про застосування флуоресцентного методу для визначення констант зв'язування ЛР з біомакромолекулами.

Аналіз публікацій останніх років дозволяє констатувати, що сьогодні поряд з органічними зондами перспективним є використання сенсibilізованої люмінесценції комплексних сполук лантанідів для підвищення чутливості детектування ДНК. Тому створення нового люмінесцентного зонду на основі комплексу іонів тербію (III) та вплив

структурних особливостей аміноалкоксипохідних флуоренону на константі зв'язування є актуальним.

В останні роки в результаті інтенсивних досліджень структури і функції альбуміну досягнуті великі успіхи в вивченні взаємодії лігандів з альбуміном, включаючи механізми регуляції, роль конформаційних перебудов, а також дослідження нових типів взаємодій та доставки ліків в тканини, що є вкрай важливим при створенні нових лікарських препаратів.

Широко застосовується для цих цілей флуоресцентний метод, але він має низку обмежень (зокрема неможливість визначати параметри зв'язування за гасінням флуоресценції білка у випадках, якщо накладається власна люмінесценція ЛП), тому вдосконалення методу для цих цілей є актуальним.

РОЗДІЛ 2

РЕАКТИВИ ТА АПАРАТУРА

2.1. Вихідні сполуки та матеріали

В роботі використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а. та бідистильовану воду.

При вивченні здатності до інтеркаляції синтезованих речовин використовували високополімерні ДНК тимуса теляти (Serva, 18560) і етидію бромід (Acros, 32722). Для приготування буферних розчинів використовували ацетат натрію, хлорид натрію (NaCl) і оцтову кислоту кваліфікації «х.ч», динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (Fluka, 03677).

Приготування вихідного концентрованого розчину ДНК тимуса теляти. 14 мг ДНК розчиняють в 100 мл води (отримують розчин "А"). 2,18 г NaCl розчиняють в 100 мл води (отримують розчин "В"). 144 мг ЕДТА розчиняють в 100 мл води (отримують розчин "С"). 20 мг етидію броміду розчиняють в 100 мл води; отримують розчин з концентрацією $2,536 \cdot 10^{-4}$ М (розчин "D").

Приготування концентрованого буферного розчину (розчин "Е"). У хімічній склянці, місткістю 500 мл, розчиняють 1,64 г безводного ацетату натрію в 20 мл води і додають по краплях розведену водою (1:3) оцтову кислоту до $\text{pH} = 5,0 \pm 0,2$. Вміст склянки кількісно переносять в мірну колбу місткістю 1000 мл і доводять водою до мітки.

Приготування контрольного розчину для вивчення витіснення. У мірну колбу місткістю 500 мл вносять 50 мл розчину А, 50 мл розчину В, 50 мл розчину С, 50 мл розчину D і 200 мл розчину Е, доводять водою до мітки (отримують розчин "F").

Розчини ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) аміноалкоксифлуоренонів отримували розчиненням їх точних наважок в воді. Робочі розчини готували відповідним розведенням водою.

Вихідний розчин хлориду тербію (0,1 моль / л) готували розчиненням

оксиду тербію високої чистоти, який попередньо прожарюють в муфельній печі протягом 1 години при 650 – 700°C, в концентрованій хлористоводневій кислоті з подальшим випаровуванням її надлишку на водяній бані. Сухий залишок розчиняли у воді та розбавляли до необхідного об'єму. Концентрацію отриманого розчину хлориду тербію контролювали комплексонометричним методом за допомогою індикатору арсеназо I в уротропіновому буферному розчині при рН $7,0 \pm 0,2$.

Реагенти L₁₋₈, що використовувалися, похідні амідів оксохінолінкарбонової кислоти, синтезовано в Національному фармацевтичному університеті (м. Харків, під керівництвом професора І.В. Українця) [169]. Розчини ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) реагентів L₁₋₈ отримували розчиненням їх точних наважок у воді. Робочі розчини реагентів готували відповідним розведенням водою.

Значення рН розчинів встановлювали за допомогою 2,86 моль/л (40%-вого) водного розчину уротропіну, який готували розчиненням 200,0 г уротропіну в воді, з подальшим підкисленням хлористоводневою кислотою до рН 7,5 і доведенням отриманого розчину водою до об'єму 500 мл.

У роботі використовували робочі стандартні зразки (РСЗ) ЛР виробництва ТДВ «ІНТЕРХІМ».

Стандартні розчини ЛР (10^{-3} моль/л) готували розчиненням їх точних наважок у воді (ТИЛ, МОР, ДАК, ІНД) або етиловому спирті (ФЕН, ГІД, ЛЕВ, ДЗП, ПРП, СОФ) з перемішуванням на магнітній мішалці. Робочі розчини ЛР готували відповідним розведенням водою.

Стандартний розчин САЛ (CAS 70024-90-7, Sigma-Aldrich) (10^{-4} моль/л) готували розчиненням наважки 665 мг в 100,0 мл води з перемішуванням на магнітній мішалці. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично з використанням молярного коефіцієнта екстинкції $36600 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$ при 280 нм [106].

Трис-НСІ буферний розчин готували розчиненням 6,057 г трис (гідроксиметил)амінометана у 800 мл води, доводили рН до 7,5 за

допомогою хлористоводневої кислоти, потім доводили об'єм розчину до 1000,0 мл водою та перемішували.

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

Сваби Alpha® Sampling Swab марки TX715 (Techwipe).

Отримані розчини фільтрують крізь мембранний фільтр (0,20 мкм; Minisart RC 25, «Sartorius», Німеччина).

2.2. Апаратура та обладнання

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 люмінесценції іонів тербію (III) реєстрували в області (480 – 620) нм с $\lambda_{\text{макс}} = 490$ нм, 545 нм та 590 нм (переходи $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$, відповідно).

Значення енергії триплетних рівнів органічних лігандів розраховували зі спектрів фосфоресценції їхніх комплексів з іоном Gd(III) при 77 К [170].

Для отримання кривих загасання люмінесценції досліджених комплексів використовували збудження зразків імпульсами світла тривалістю до 6 мс, з часовим розділенням 10 мкс і 30 повторами. Значення часів життя збудженого стану іонів тербію розраховували з використанням програмного забезпечення Cary Eclipse.

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).

Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метра серії Seven

Easy фірми Mettler Toledo, Китай (діапазон вимірювань рН від 0,00 до 14,00; відносна похибка вимірювань $\pm 0,01$ од. рН) зі скляним електродом, калібрування якого проводили за допомогою стандартних буферних розчинів.

Точні наважки речовин брали за допомогою аналітичних ваг AUX 220 (Shimadzu) ($220 \text{ г} \pm 0,005 \text{ г}$).

Очищену воду отримували з використанням системи очищення води Arrium® pro UV/UF фірми Sartorius.

При пробопідготовці використовували магнітні мішалки типу ARE (VELP Scientifica, Італія) з підігрівом.

Автор висловлює щиру подяку д.х.н., професору І.В. Українцю (Харківський національний фармацевтичний університет) за синтез реагентів, які використані в дисертаційній роботі.

Автор вдячний за допомогу у виконанні експериментальної частини роботи співробітникам НДАЛ (ТДВ «ІНТЕРХІМ») – к.х.н. Ю. В. Скрипинець, к.х.н. І. І. Леоненко.

Автор висловлює щиру подяку д.х.н., професору А.В. Єгоровій (Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України) за корисні рекомендації та критичні зауваження.

РОЗДІЛ 3
КОМПЛЕКСИ ЛАНТАНІДІВ З ПОХІДНИМИ АМІДІВ
ОКСОХІНОЛІНКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ – ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ
ЗОНДИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ АФІНІТЕТУ АМІНОАЛКОКСИ-
ФЛУОРЕНОНІВ ДО ДНК ТА ЇЇ ВИЗНАЧЕННЯ

Раніше в межах робіт, що проводяться у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, зі синтезу і вивченню властивостей потенційних противірусних препаратів синтезовано аналоги тилорону, в яких змінювалася будова термінальної алкіламіногрупи і довжина бічного ланцюга.

Представляло інтерес вивчити афінитет отриманих сполук до ДНК і проаналізувати вплив будови цих сполук на величину константи зв'язування.

3.1 Спектральні властивості нових аміноалкоксифлуоренонів

Аміноалкоксифлуоренони відносяться до класу сполук, що взаємодіють з нуклеїновими кислотами шляхом інтеркаляції. Похідні АФ (таблиця 3.1) синтезували за способом [171], взаємодією 2,7-біс-(ω -іодалкокси) флуоренонів з відповідними вторинними амінами (рисунок 3.1).

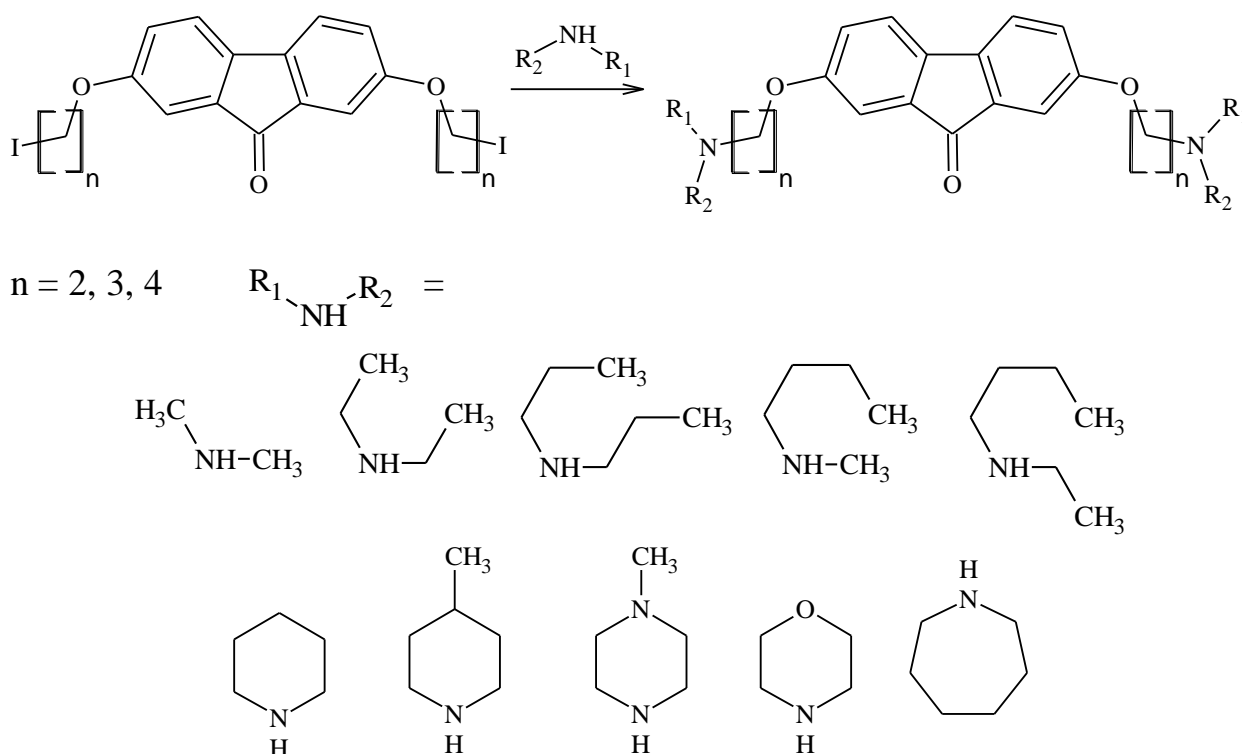


Рисунок 3.1 – Схема утворення похідних аміноалкоксифлуоренонів

Методика синтезу

Як розчинники та реактиви використовували речовини кваліфікації х.ч.

В якості вихідних речовин для синтезу використовували відповідні 2,7-біс-(ω -іодалкокси)флуоренони з чистотою не менше 98%:

- 2,7-біс -(2-іодэтокси)флуорен-9-он;
- 2,7-біс -(3-іодпропокси)флуорен-9-он;
- 2,7-біс -(4-іодбутокси)флуорен-9-он.

До розчину 0.01 моль відповідного 2,7-біс-(ω -іодалкокси)флуорен-9-ону в 50 мл диметилформаміду додавали 0.0402 моль відповідного вторинного аміну (рисунок 3.1) і витримували протягом 24 годин (в разі отримання диметиламінопохідних використовували 40%-ий розчин диметиламіну в воді). Потім реакційну масу виливали в 500 мл води та екстрагували хлороформом. Екстракт промивали водою до нейтральної реакції та сушили над сульфатом натрію. Розчин упарювали за зниженого тиску, залишок після відгону кристалізували з гексану. Отриману основу АФ розчиняли в 10 мл сухого ізопропілового спирту та додавали 2 мл концентрованої (33 - 37%) хлористоводневої кислоти. Осад, що випав, відфільтрували, промивали ацетоном і сушили. Вихід становив 85 – 92%.

Синтезовані сполуки отримано із вмістом основної речовини не менш за 98 %. Якість контролювали методом ВЕРХ. Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity 2D LC System (США) з діодно-матричним детектором, а також мас-спектрометричним детектором (6530 Accurate Mass Q-TOF, Agilent Technologies, США, джерело іонізації – електроспрей (ESI)), колонку з ніржавіючої сталі розміром 100 мм \times 4,6 мм, заповнена сорбентом типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 3,5 мкм, використовуючи як рухому фазу суміш амонійно-форміатного буферного розчину рН = 8,5 – ацетонітрил у співвідношенні 45/55.

Отримані сполуки ідентифікували за допомогою методів мас-спектрометрії й ІЧ-спектроскопії.

У мас-спектрах всіх синтезованих алкіламіноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренона спостерігався сигнал молекулярного іона й піки осколкових іонів.

У випадку 2,7-біс-[2-(4-метилпіперазин-1-іл)алкокси]-флуорен-9-онів (R_{22} , R_{23} , R_{24}) і 2,7-біс-[2-(4-метилпіперидин-1-іл)алкокси]-флуорен-9-онів (R_{19} , R_{20} , R_{21}) спостерігається відрив однієї із двох N-алкіламіноалкильних груп з масами осколкових іонів – 127 і 125 відповідно, а залишкова частина молекул проявляється у вигляді сигналів із $M/Z = 337$, 351, 365 та 335, 349, 363 відповідно для R_{22} , R_{23} , R_{24} і R_{19} , R_{20} , R_{21} .

У мас-спектрах 2,7-біс-[2-(азепан-1-іл)алкокси]флуорен-9-онів (R_{28} , R_{29} , R_{30}) і 2,7-біс-[2-(дипропіламіно)алкокси]-флуорен-9-онів (R_7 , R_8 , R_9) спостерігається відрив відразу двох N-алкіламіноалкильних груп, що проявляється в наявності інтенсивних сигналів з $M/Z = 126$ і 128, і піків з $M/Z = 210$ і 211.

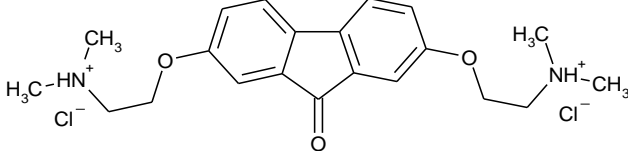
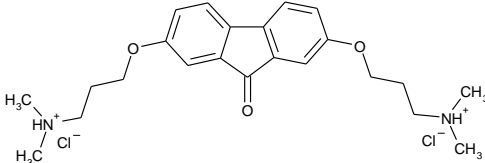
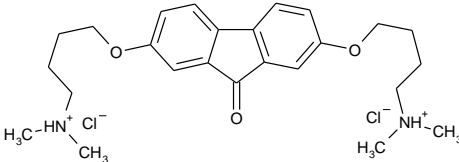
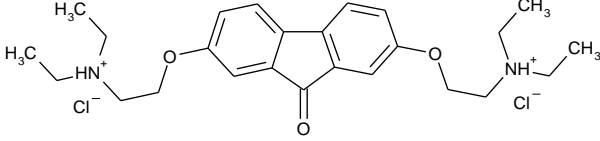
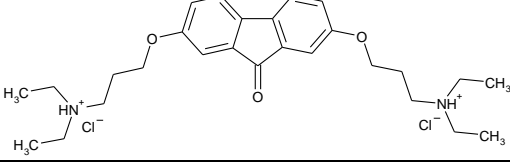
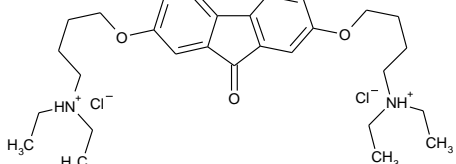
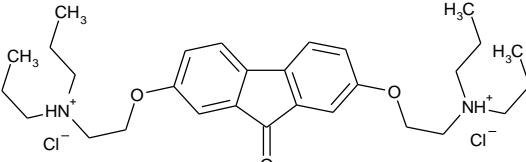
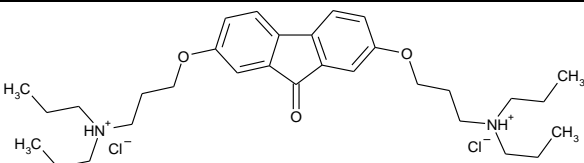
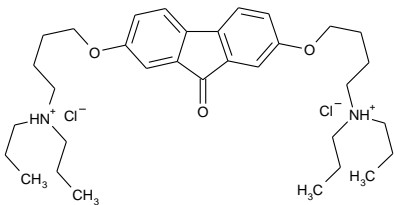
У мас-спектрах 2,7-біс-[2-(метилбутіламіно)алкокси]-флуорен-9-онів (R_{10} , R_{11} , R_{12}) і 2,14,7-біс-[2-(етилбутіламіно)алкокси]-флуорен-9-онів (R_{13} , R_{14} , R_{15}) крім піків відповідних N-алкіламіноалкильним групам з $M/Z = 114$ і 156, присутні сигнали, що відповідають розпаду алкіламінного радикалу.

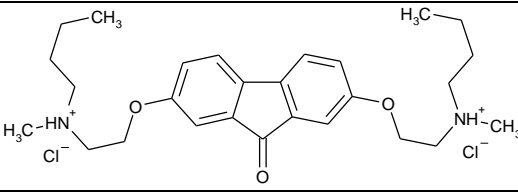
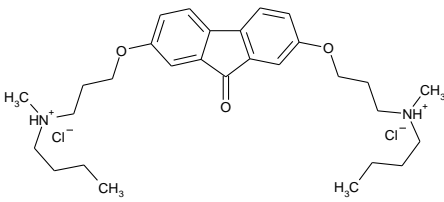
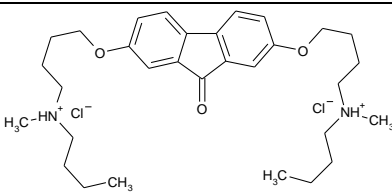
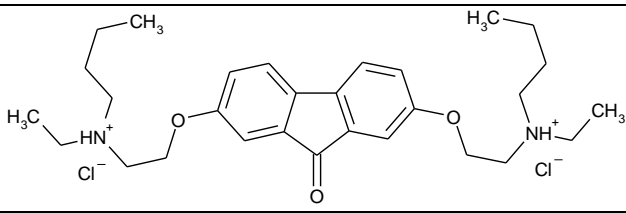
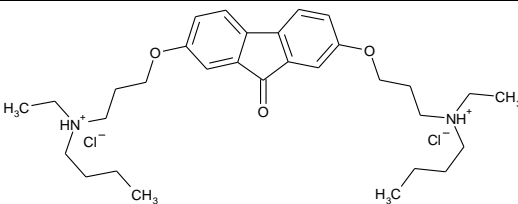
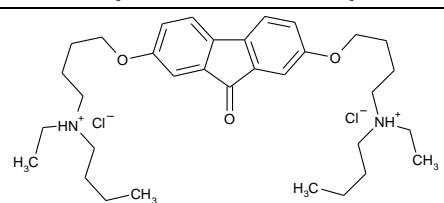
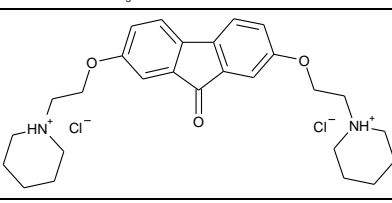
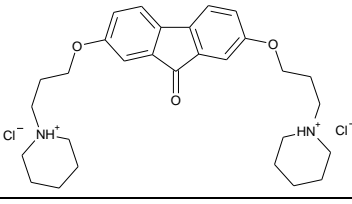
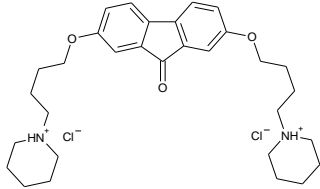
В ІЧ-спектрах отриманих сполук (таблетки KBr) спостерігалася характерна смуга поглинання карбонільної групи флуоренонового фрагменту в області від 1705 до 1730 cm^{-1} , смуги поглинання, що відповідають коливанням зв'язку C–O в області від 1020 до 1275 cm^{-1} , а також спостерігалися смуги поглинання аліфатичних C–H-зв'язків в області від 2690 cm^{-1} до 2970 cm^{-1} . Частоти коливань карбонільних груп є симбатними електронегативності термінальної аміногрупи.

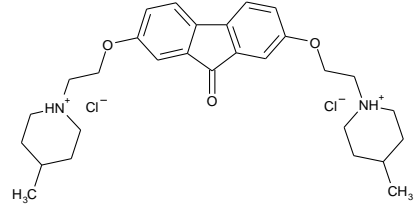
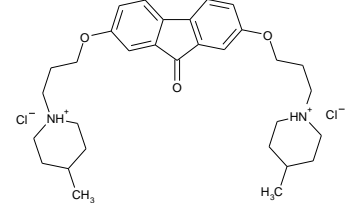
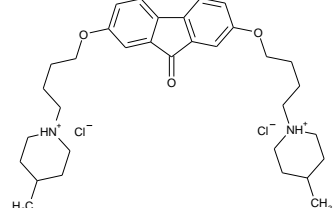
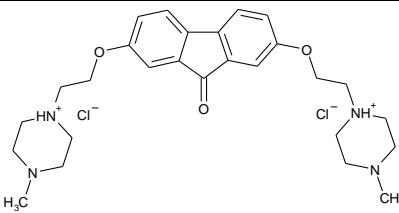
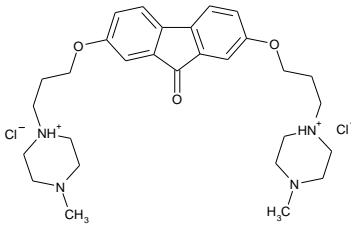
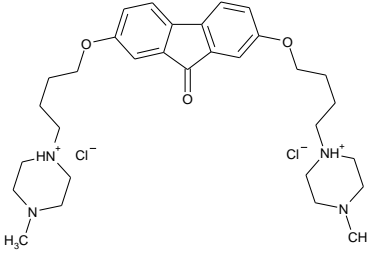
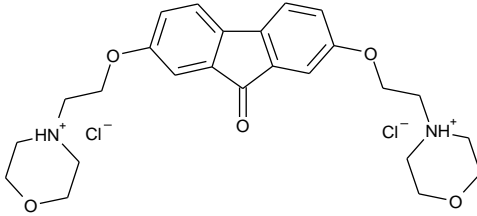
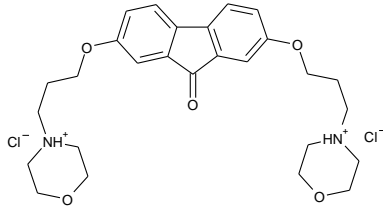
Структурні формули синтезованих сполук наведено в таблиці 3.1.

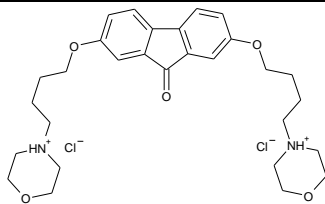
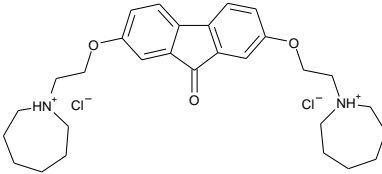
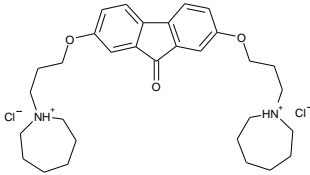
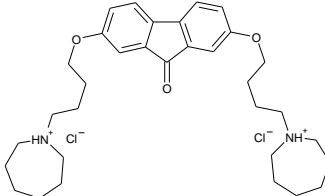
Таблиця 3.1

Похідні досліджуваних аміноалкоксифлуоренонів

№ R	Структурная формула	М.М
1	2	3
1		427.37
2		455.42
3		483.47
4		483.47
5		511.53
6		539.58
7		539.58
8		567.63
9		595.69

1	2	3
10		511.53
11		539.58
12		567.64
13		539.58
14		567.64
15		595.69
16		507.50
17		535.55
18		563.61

1	2	3
19		535.55
20		563.61
21		591.66
22		537.53
23		565.58
24		593.63
25		513.46
26		541.51

1	2	3
27		569.57
28		535.55
29		563.61
30		591.66

Спектри поглинання деяких АФ у водних розчинах показані на рисунках 3.2 – 3.4 та характеризуються наявністю смуг поглинання в ультрафіолетовій і видимій областях. Молярні коефіцієнти поглинання для деяких АФ представлено в таблиці 3.2.

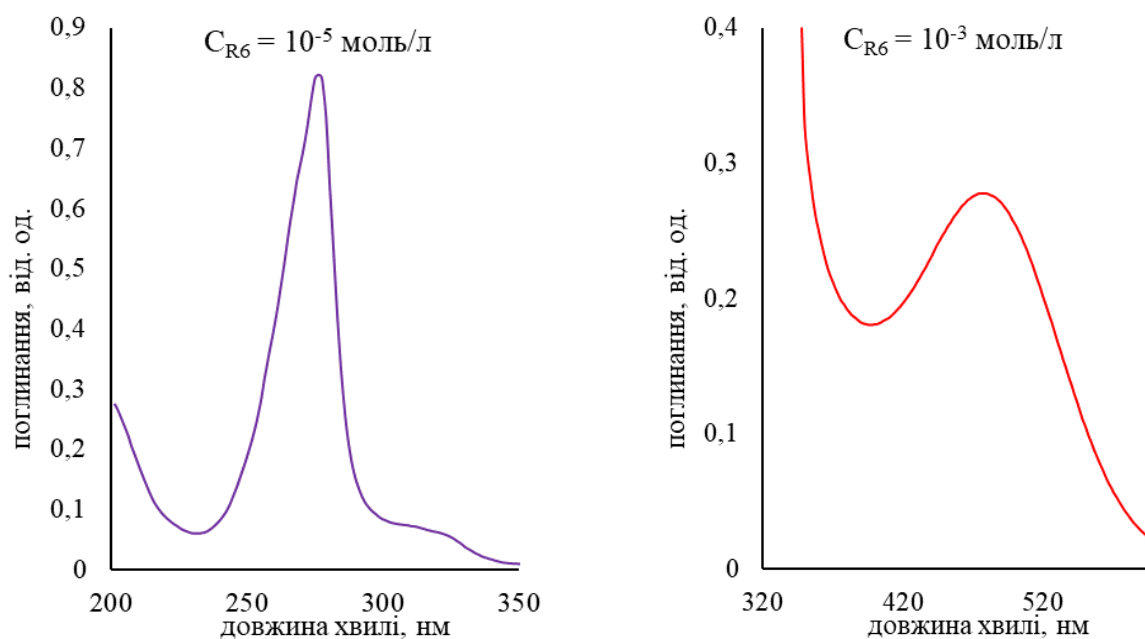
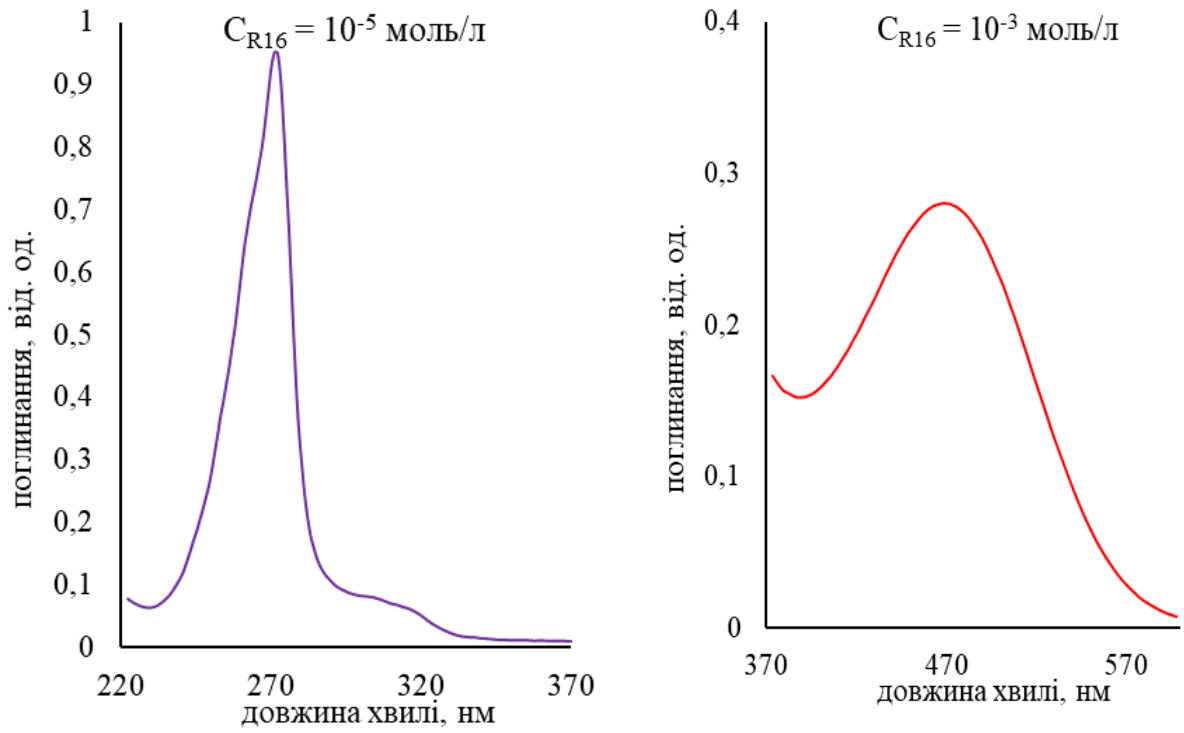
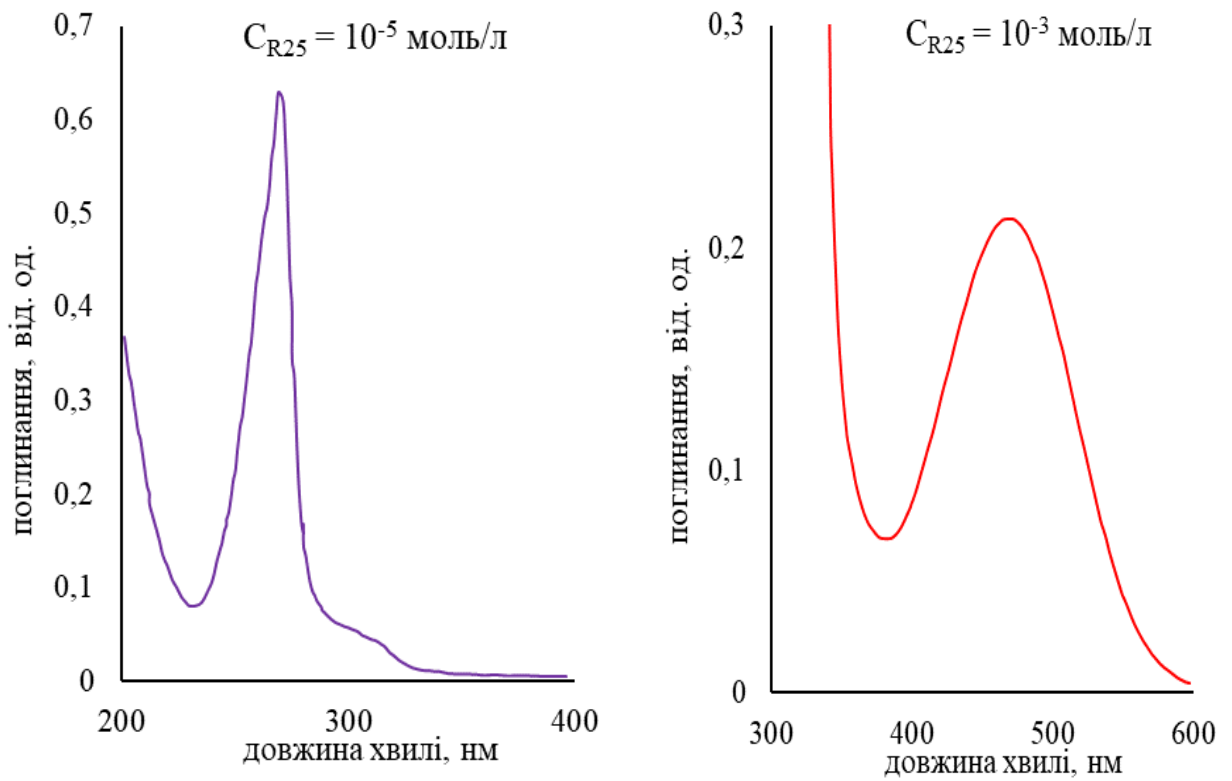


Рисунок 3.2 – Спектри поглинання АФ R₆

Рисунок 3.3 – Спектри поглинання АФ R₁₆Рисунок 3.4 – Спектри поглинання АФ R₂₅

Таблиця 3.2

Оптичні властивості деяких похідних аміноалкоксифлуоренонів

R	Поглинання			
	УФ - область		видима область	
	λ_{\max} , нм	ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	λ_{\max} , нм	ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹
R ₃	271,0	61400	480,0	237
R ₅	271,0	100800	475,0	269
R ₆	271,0	82900	477,0	278
R ₇	270,0	101800	470,0	285
R ₁₀	270,0	66000	467,0	252
R ₁₆	270,0	95800	467,0	280
R ₁₈	270,0	105600	480,0	261
R ₂₂	271,0	82200	472,0	234
R ₂₃	271,0	38100	474,0	142
R ₂₅	270,0	63900	468,0	213
R ₂₇	271,0	135300	477,0	280
R ₂₈	270,0	129500	467,0	272

3.2 Спектральні характеристики похідних амідів оксохінолінкарбонової кислоти та їх комплексів з іонами тербію (III) та ДНК

Поряд з органічними зондами для визначення ДНК застосовуються комплексні сполуки лантанідів. Представляло інтерес розробити новий люмінесцентний зонд на основі комплексної сполуки іону лантаніду для вивчення взаємодії ДНК з молекулами лікарських речовин.

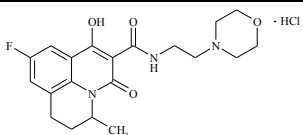
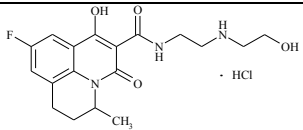
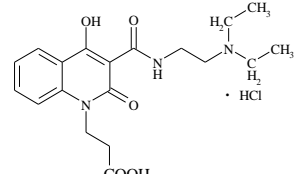
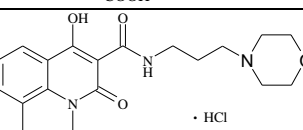
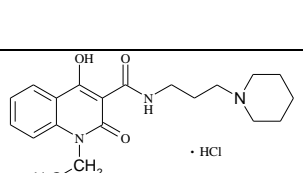
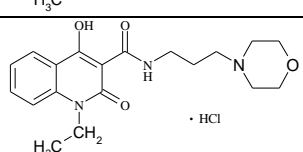
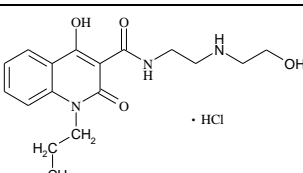
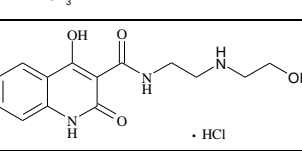
У якості комплексоутворювачів були використані реагенти – похідні 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти L₁₋₈. Реагенти, що використовувалися, являють собою безбарвні кристалічні речовини з чіткими температурами плавлення, добре розчинні у воді. Структурні формули реагентів представлено в таблиці 3.3.

Спектри поглинання лігандов (L₁₋₈) у водних розчинах характеризуються наявністю двох смуг в ультрафіолетовій області спектру

(таблиця 3.3) (рисунок 3.5) з високими молярними коефіцієнтами поглинання (ϵ), що вказує на ефективне поглинання ними світлової енергії.

Енергії триплетних рівнів вивчених лігандів (таблиця 3.3), які розраховані зі спектрів фосфоресценції їх комплексів з іоном гадолінію (III) при 77К (20580-20930 cm^{-1}), є вищими за енергії рівнів збудженого стану іонів Tb(III) (20500 cm^{-1}).

Таблиця 3.3
Спектрально-люмінесцентні характеристики лігандів (*) та їх комплексів з іонами тербію ($C_{\text{Tb}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C_{\text{L}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; pH 7,5)

№	Реагент	T^*, cm^{-1}	λ^*, nm	$\epsilon \cdot 10^4 *$	Tb(III)-L		
					$\lambda_{\text{збуд}}, \text{nm}$	F, відн. од	τ , мкс
1		20580	341 292 236	0.81 1.70 4.00	260 314	962	948
2		20590	339 292 234	0.70 1.62 3.80	252 302	442	733
3		20650	340 293 235	0.65 1.50 3.60	261 301	697	833
4		20720	339 291 236	0.52 1.32 3.40	262 310	569	760
5		20550	341 293 237	0.47 1.50 3.64	262 301	608	819
6		20740	339 292 235	0.38 1.22 3.07	260 304	730	875
7		20930	341 293 237	0.47 1.50 3.64	260 300	418	726
8		20870	340 293 235	0.38 1.22 3.07	250 300	362	681

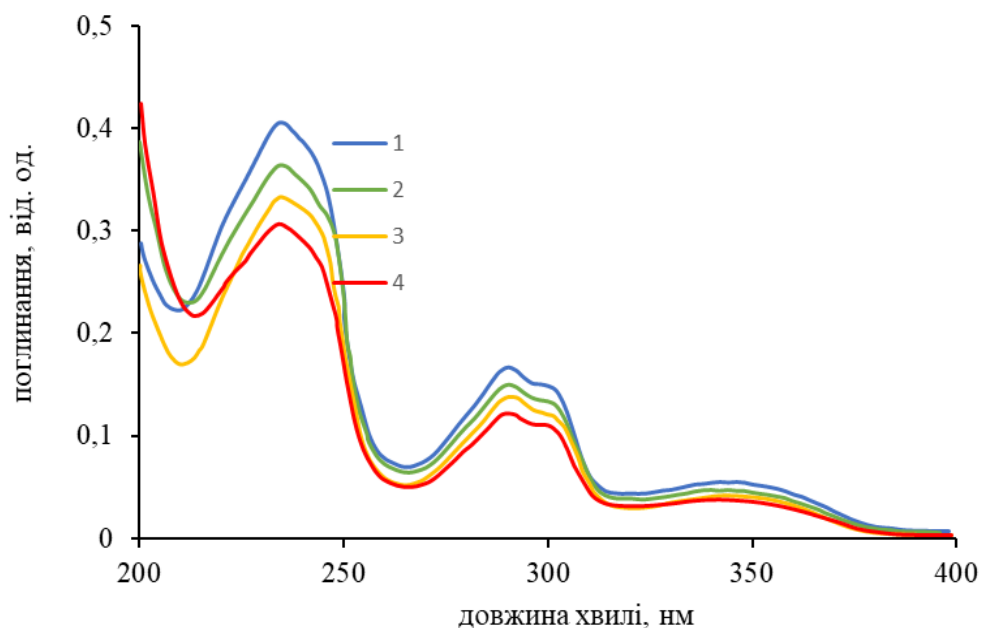


Рисунок 3.5 – Спектри поглинання розчинів лігандів 1 – L_1 ; 2 – L_2 ; 3 – L_3 4 – L_4 ($C_L = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $l = 1$ см)

Кінетика гасіння люмінесценції для смуг з максимумом при 545 нм для іонів Tb(III) (5D_4) є експоненційною і може бути охарактеризованою часом життя τ , значення яких для всіх лігандів наведено у таблиці 3.3.

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 зі зазначеними лігандами може здійснюватися ефективний перенос енергії від органічної частини молекули до іона лантаніду.

Оскільки взаємодія Tb(III) з лігандами L_{1-8} раніше не було описано в літературі, нами вивчені умови їх комплексоутворення і деякі спектрально - люмінесцентні властивості утворюваних комплексів.

З метою виявлення придатності використання сенсibilізованої люмінесценції комплексних сполук іонів Tb(III) з похідними оксохінолін-3-карбонової кислоти проведено систематичне вивчення люмінесцентних властивостей комплексів в оптимальних умовах отримання люмінесцентного аналітичного сигналу. У зв'язку з цим досліджено залежності інтенсивності люмінесценції комплексів від кислотності середовища, природи розчинника,

присутності поверхнево-активних (ПАР) та донорно-активних (ДАР) речовин. Розраховано час життя збудженого стану іонів Tb(III) в комплексних сполуках з даними лігандами. Встановлено нами спектрально-люмінесцентні характеристики похідних 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти та їх комплексів з іонами Tb(III) представлено в таблиці 3.3.

Спектри збудження всіх вивчених комплексів характеризуються наявністю двох смуг в УФ області спектра з максимумами ($\lambda_{збуд}$) від 250 нм до 262 нм та від 300 нм до 314 нм, які можуть бути віднесені до $\pi^* \rightarrow \pi$ та $\pi^* \rightarrow n$ переходів в молекулах лігандів, що підтверджується відповідністю з їх спектрами поглинання (таблиця 3.3). Для прикладу представлено спектри збудження комплексів Tb(III) з деякими вивченими лігандами (рисунок 3.6).

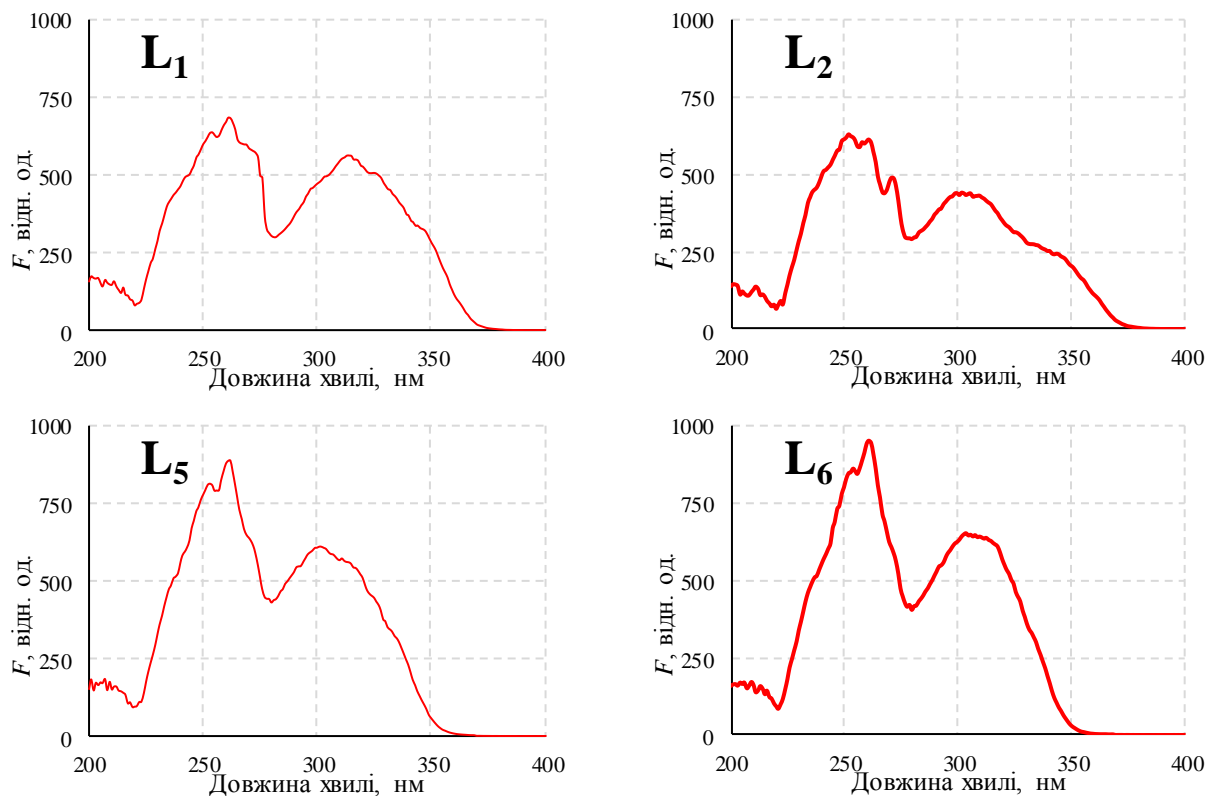


Рисунок 3.6 – Спектри збудження комплексів Tb(III) з L₁₋₈ ($C_{Tb^{3+}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л; $C_L = 5 \times 10^{-5}$ моль/л)

Однією з основних характеристик люмінесценції є її тривалість, яка визначається часом життя збудженого стану (τ). Тривалість гасіння

люмінесценції лантанідів в різних сполуках відображає зміну їх найближчого оточення. У зв'язку з цим вивчено кінетика згасання люмінесценції Tb(III) в комплексах з L₁₋₈. Для прикладу на малюнку 3.7 наведені криві згасіння люмінесценції комплексів іонів тербію (III) з L₁₋₄.

Інтенсивність люмінесценції комплексів залежить також від концентрації реагенту. Встановлено, що для досягнення максимальної інтенсивності люмінесценції необхідно 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 із співвідношенням компонентів Tb:L₁₋₈ = 1:2.

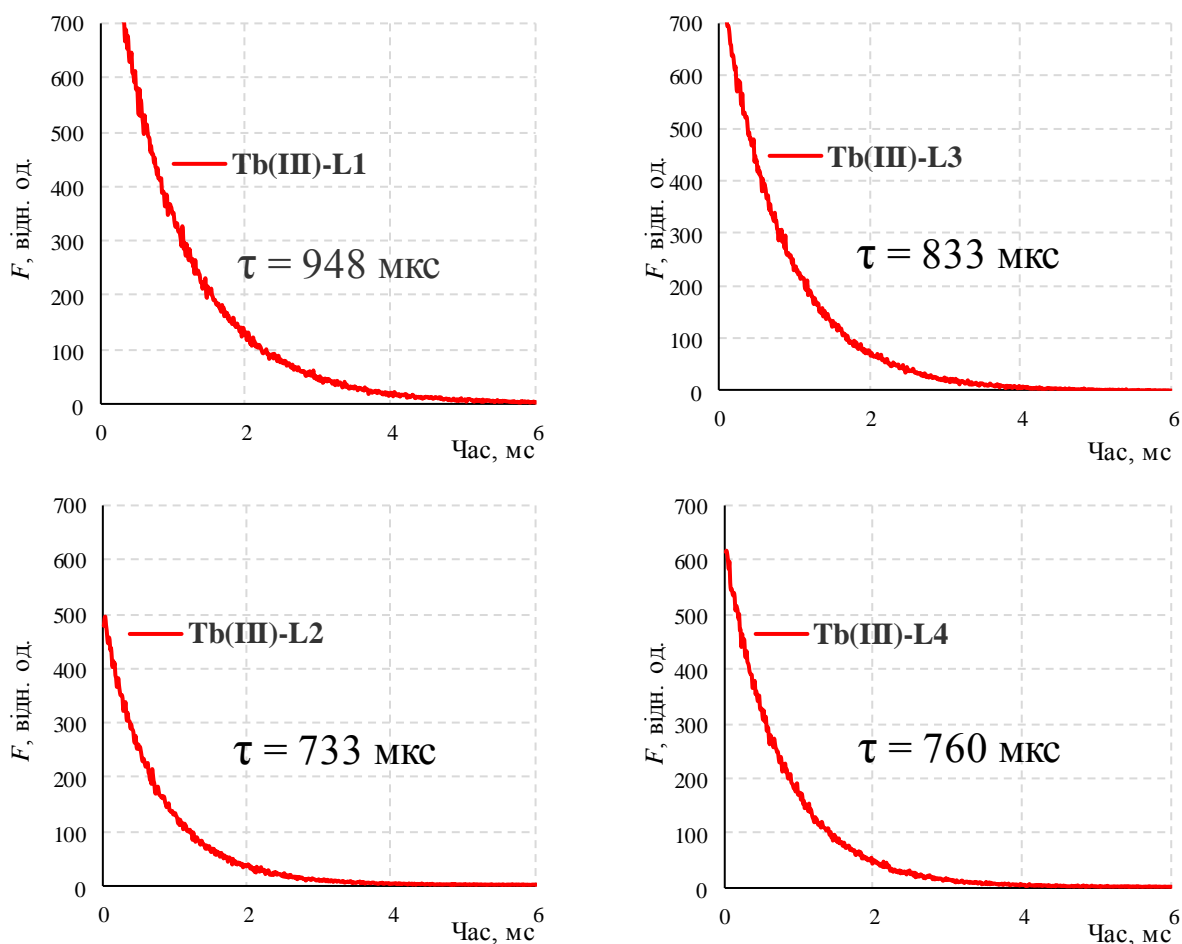


Рисунок 3.7 – Криві гасіння люмінесценції комплексів Tb – L₁₋₄ (C_{Tb} = 1×10⁻⁵ моль/л; C_{L₁₋₄} = 5×10⁻⁵ моль/л)

Для прикладу на рисунку 3.8 представлено залежність F від концентрації L_2 (а), та визначення співвідношення компонентів в комплексі Tb- L_2 методом обмеженого логарифмування (б).

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 3.9). При більш низьких значеннях рН ступінь утворення комплексів є малою, а в лужних розчинах (при рН>9) хелатоутворенню перешкоджає гідроліз іону лантаніда.

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

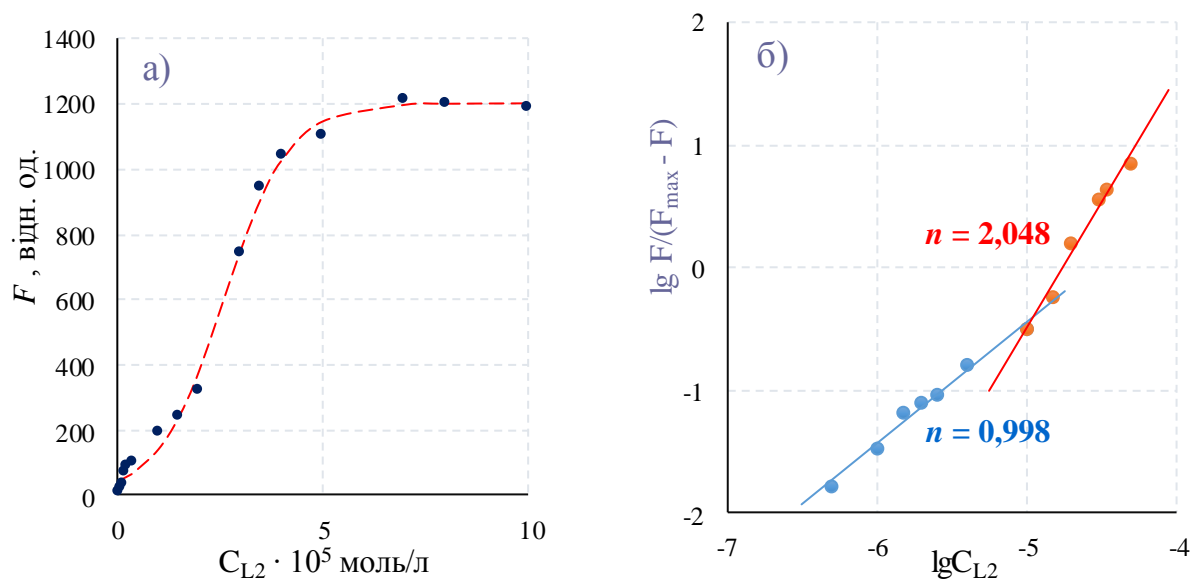


Рисунок 3.8 – Залежність F від концентрації L_2 (а); визначення співвідношення компонентів у комплексі Tb- L_2 методом обмеженого логарифмування (б) ($C_{Tb} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

Вивчено вплив на люмінесценцію комплексів Tb(III) - L_{1-8} органічних розчинників (метанол, етанол, ацетон, ацетонітрил, диметилформамід, диметилсульфоксид, ін.), поверхнево-активних речовин (лаурилсульфат натрію, цетилсульфат натрію, цетилпіридиній бромід, октадецилпіридиній бромід, Твін-80, Тритон Х-100), донорно - активних добавок (ТОФО, ТФФО, 1,10-фенантролін, 2,2' -дипіриділ).

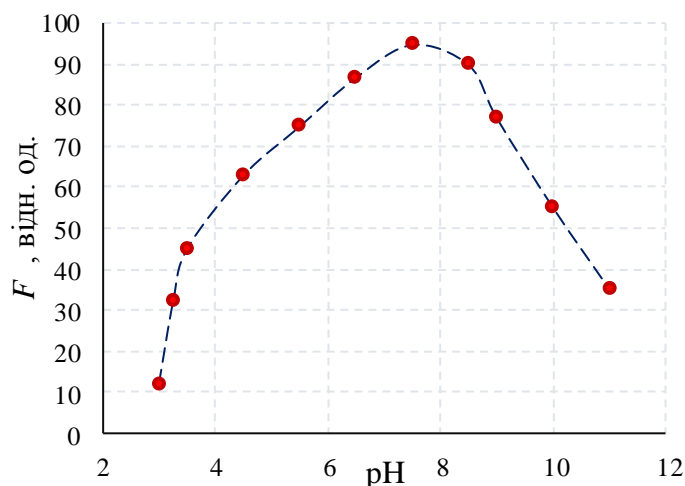


Рисунок 3.9 – Залежність інтенсивності люмінесценції комплексу Tb-L₂ від кислотності середовища ($C_{Tb} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{L2} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

Встановлено, що вплив органічних розчинників, ПАР і ДАР на збільшення інтенсивності люмінесценції вивчених комплексів є незначним, і дані комплексні сполуки можуть використовуватись як аналітичні форми у водному середовищі без додавання допоміжних речовин, що спрощує їх застосування в аналізі.

Комплексні сполуки Tb(III) з похідними 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти відповідають основним вимогам, що пред'являються до люмінесцентних зондів в біоаналізі: фотостабільність; хороша розчинність у воді; відсутність токсичності; висока інтенсивність люмінесценції; можливість елімінування фонового випромінювання (великий стоксів зсув, тимчасова дискримінація люмінесцентного сигналу в мікросекундному діапазоні часу). Отже, є можливість використовувати вивчені комплекси в якості люмінесцентних зондів для цілей біоаналітичної хімії.

3.3 Результати вивчення афінітету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК з новим лантанідним зондом

З метою виявлення придатності застосування нових комплексних сполук тербію з L₁₋₈ для визначення ДНК і вивчення афінітету до ДНК деяких противірусних препаратів, представляло інтерес вивчення їх люмінесцентних властивостей в присутності ДНК. Отримані дані представлено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4
Спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів з іонами тербію
у відсутності та присутності ДНК
($C_{\text{ДНК}}=1$ мкг/мл; $C_{\text{Tb}}=C_{\text{L}}=1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; рН 7.5)

№ 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

Вивчено люмінесцентні властивості комплексів за відсутності і в присутності ДНК. 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 разів відповідно). В подальшій роботі вивчали взаємодію в системі Tb(III)-L₂-ДНК, для якої спостерігається максимальне збільшення інтенсивності люмінесценції в присутності ДНК.

Підтвердженням взаємодії в системі Tb(III)-L-ДНК є зміни в спектрах збудження потрійних систем Tb(III)-L_{2,5,7,8}-ДНК (гіпер- і батохромний зсуви) у порівнянні зі спектрами збудження комплексів Tb(III)-L_{2,5,7,8} (рисунок 3.10), а також збільшення часу життя збудженого стану ⁵D₄ іонів Tb(III) в потрійних системах. яке є свідченням зменшення втрати енергії збудження випромінювання в потрійній системі, що призводить до збільшення інтенсивності люмінесценції іонів Tb(III) (рисунок 3.11).

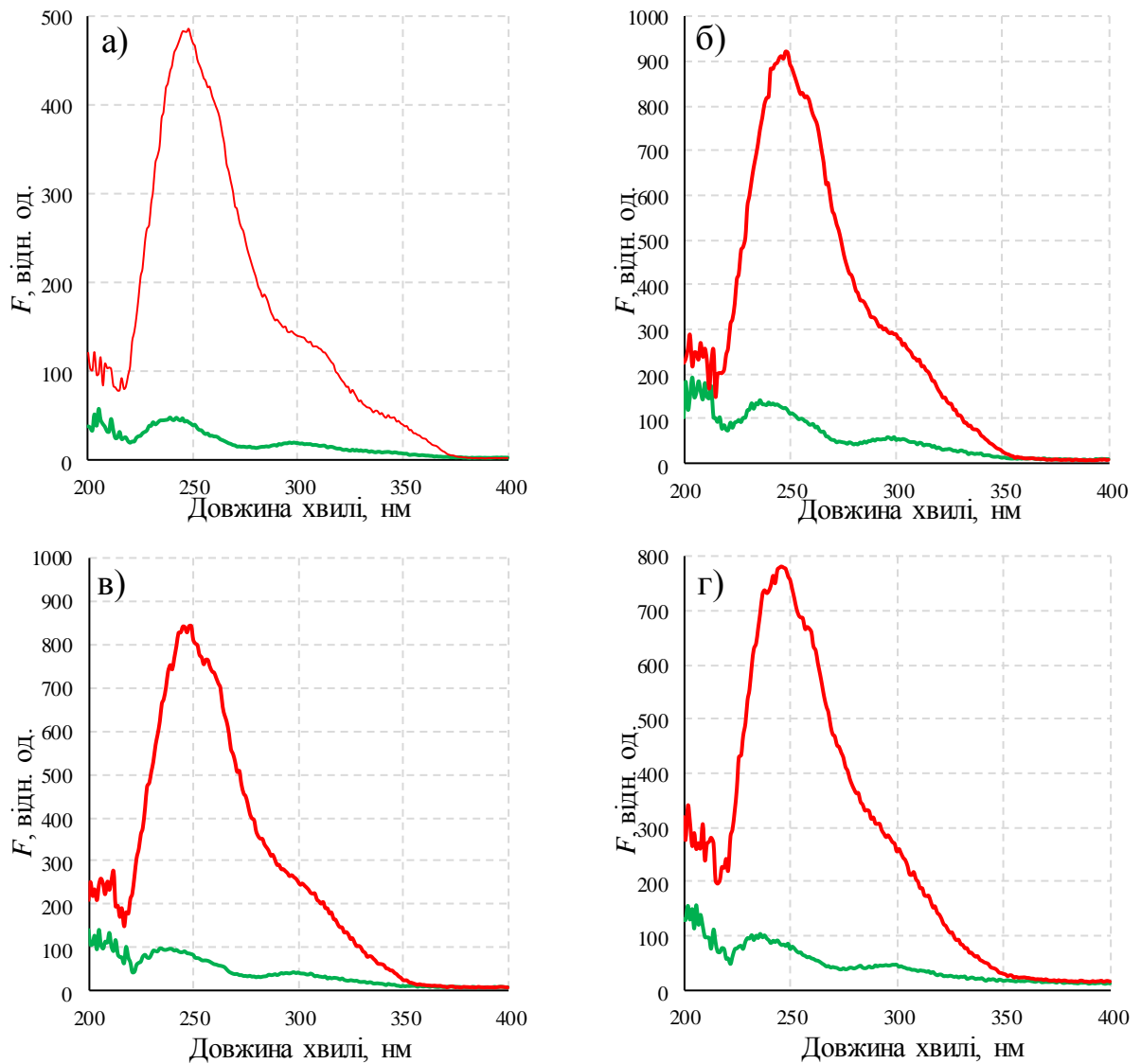


Рисунок 3.10 – Спектри збудження комплексів Tb(III) – L і Tb(III) – L– ДНК (а – L₂; б – L₅; в – L₇; г – L₈) ($C_{Tb} = C_L = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{ДНК} = 1.0$ мкг/мл, рН 7.5, $\lambda_{еміс} = 545$ нм)

Вивчено вплив концентрацій тербію (III) і реагентів на F потрійної системи Tb(III)-L-ДНК. Встановлено, що оптимальними є рівні концентрації тербію і реагентів ($1 \cdot 10^{-6}$ моль/л), за таких концентраційних умов утворюється комплекс Tb(III)-L зі співвідношенням компонентів 1 : 1.

В останні роки вивчення взаємодії «малих» молекул (лікарських препаратів) з нуклеїновими кислотами представляє величезний інтерес для розробки нових протипухлинних та противірусних препаратів, а також для отримання інформації про зв'язуванні, фізико-хімічні властивості асоційованих комплексів («малих» молекул-ДНК).

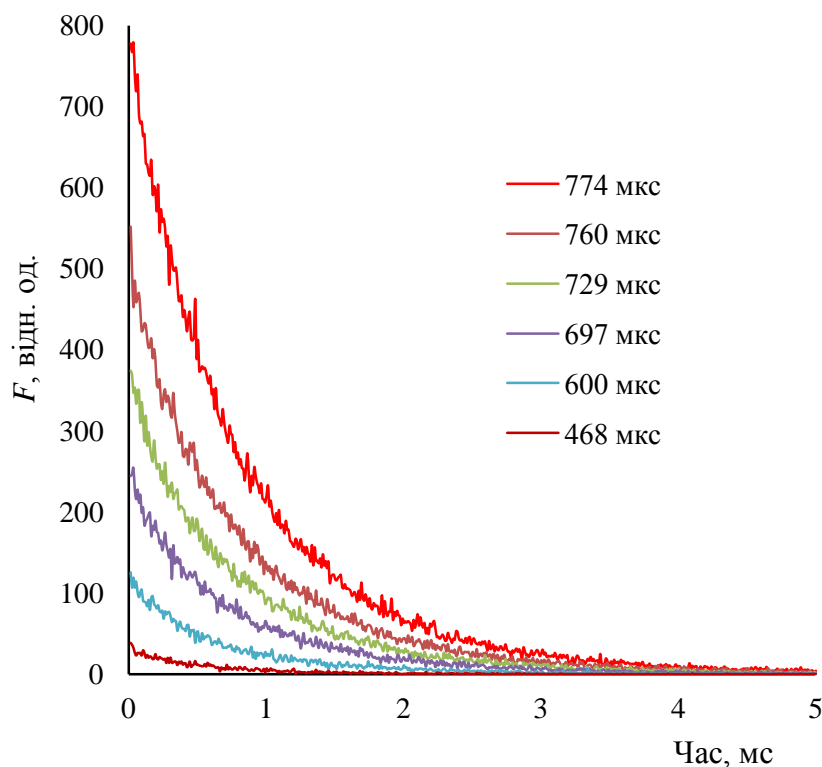


Рисунок 3.11 – Криві згасіння люмінесценції: Tb(III)-L₂-ДНК (C_{Tb} = C_{L2} = 10⁻⁶ моль/л; рН 7.5)

Така інформація дозволяє судити про біоефективність нових препаратів. А це, в свою чергу, дозволяє створювати більш ефективні хемотерапевтичні агенти для лікування багатьох видів захворювань. Взаємодія «малих» молекул з ДНК здійснюється за чотирма типами: інтеркаляційних, у жолоб, електростатичне та утворення асоціатів на поверхні молекул ДНК. Типи взаємодій встановлюють за допомогою віскозиметрії, електрохімічних методів, УФ та видимої спектрофотометрії, кругового дихроїзму, флуоресцентної спектроскопії.

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).

Як відомо, ЕБ – класичний інтеркалятор, механізм взаємодії якого з ДНК вважається однозначно встановленим. Однак використовувати для цієї мети комплекс Tb(III)-L₂ виявилось неможливим, оскільки в спектрі його люмінесценції при концентрації тербію (III) понад 3·10⁻⁶ моль/л спостерігається накладення смуги люмінесценції іону Tb(III) (⁵D₄ → ⁷F₄,

$\lambda = 590$ нм) на смугу люмінесценції ЕБ ($\lambda = 595$ нм). Оскільки іони алюмінію (III) і тербію (III) близькі за властивостями комплексоутворення, ми спробували замінити комплекси Tb(III)-L₂ на комплекси Al(III)-L₂, які не здатні до випромінювання. Нами встановлено, що інтенсивність люмінесценції зменшується при додаванні комплексів Al(III)-L₂ до розчину, який містить ЕБ та ДНК.

Методика

В ряд мірних колб об'ємом 10.0 мл вносили по 5,0 мл *контрольного* розчину для вивчення витіснення (розчин "F") і по 0; 0.05; 0.10; 0.50; 1.00 робочого розчину комплексу Al-L₂ ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 0.30; 0.50; 0.70 1.00 мл робочого розчину комплексу Al-L₂ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); 0.30; 0.50; 0.70 1.00 мл робочого розчину комплексу Al-L₂ ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 0.50; 1.00; 5.00 мл робочого розчину комплексу Al-L₂ ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), доводили розчини до 10.0 мл водою і перемішували. За 5 хвилин вимірювали F при $\lambda_{\text{еміс}} = 611$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 300$ нм).

Спектри, отримані в результаті флуоресцентного титрування ДНК - ЕБ комплексом Al-L₂, представлено на рисунку 3.12.

Відповідна залежність витіснення ЕБ від $\lg C_{\text{Al-L}_2}$ представлено на рисунку 3.13, з якої розраховували значення $\lg C_{50}$ – концентрації комплексу, за якої спостерігається 50% витіснення ЕБ з ДНК.

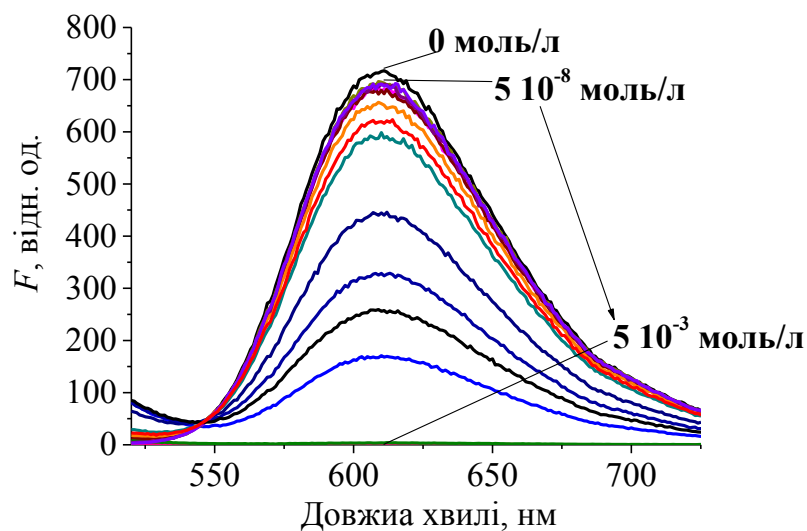


Рисунок 3.12 – Спектри флуоресценції інтеркальованого етидію броміду ($C_{\text{ЕБ}} = 1,27 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ДНК}} = 1,06 \cdot 10^{-5}$ моль/л) у присутності змінних концентрацій комплексу Al-L₂

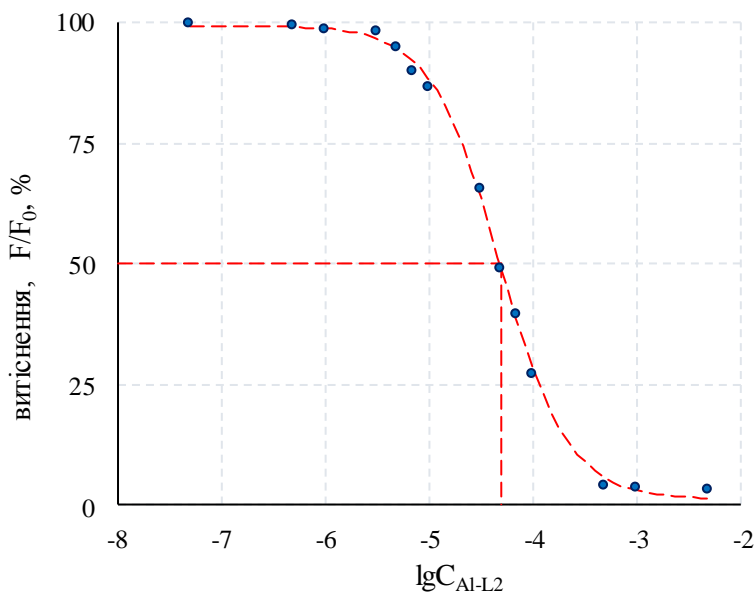


Рисунок 3.13 – Крива витіснення комплексом Al-L₂ ЕБ з його сполуки з ДНК

Досліджуваний зонд Tb(III)-L₂ в експериментах по витісненню інтеркальованого етидію бромиду 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 за [172] ($\lg K_{\text{Tb-L}} = 6.42 \pm 0.03$).

Отримано константу зв'язування є типовою для інтеркаляторів.

Методом конкуренції з новим тербієвим зондом (комплексом Tb(III)-L₂) показано, що всі синтезовані сполуки є інтеркалятори ДНК, визначено логарифми констант асоціації синтезованих АФ з ДНК.

Спектри, отримані в методі люмінесцентного титрування Tb(III)-L₂-ДНК для деяких алкіламіноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуорена, наведено на рисунку 3.14. Збільшення концентрації АФ призводить до гасіння люмінесценції зонда, що свідчить про збільшення частки зв'язування АФ з ДНК.

Відповідні залежності витіснення Tb(III)-L₂ від $\lg C_R$ деяких АФ представлено на рисунку 3.15, з яких обчислювали значення $\lg C_{50}$.

Загальноприйнятим параметром, що відображає афінність ліганда до ДНК, є концентрація ліганда, яка призводить до 50%-го зниження інтенсивності флуоресценції зонда (C_{50}), яку визначали, як абсцису точки

перегину кривої залежності «Витіснення, %» – $\lg C$, де «Витіснення, %» – ступінь зменшення інтенсивності флуоресценції розчину (в % до контролю) при постійній концентрації зонда і ДНК. Апроксимацію результатів проводили засобами програми Origin 8.5.

Криві витіснення в полулогарифмічних координатах є сигмоїди і надають можливість для зручного і точного обчислення $\lg C_{50}$ – концентрації, що призводить до 50%-го витіснення зонда из комплексу з ДНК.

Логарифм константи асоціації ліганда з ДНК розраховували за формулою (3.1):

$$\lg K_A = \lg C_{Tb-L} - \lg C_{50} + \lg K_{Tb-L}, \quad (3.1)$$

де:

K_A – константа асоціації з ДНК досліджуваного речовини,

K_{Tb-L} – константа асоціації ДНК з комплексом Tb(III)-L₂ ($\lg K_{Tb-L} = 6.42 \pm 0.03$),

C_{50} – концентрація ліганда, що призводить до 50%-го зниження інтенсивності флуоресценції,

C_{Tb-L} – аналітична концентрація комплексу Tb(III)-L₂, застосована в експерименті.

Розраховані значення логарифмів констант зв'язування представлено в таблиці 3.9.

Для підтвердження правильності визначення констант зв'язування з ДНК алкіламіноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренона з використанням люмінесцентного зонда на основі комплексної сполуки тербію було проведено аналогічне дослідження для 6 АФ з використанням етидію броміду. Як зазначалося раніше, для доказу інтеркаляційного характеру взаємодії ліганда з ДНК достатнім є встановлення факту його конкуренції за місця зв'язування з відомим інтеркалятором, параметри асоціації якого з полінуклеотидом встановлено незалежним методом однозначно. Одним з таких лігандів є етидію бромід, що є "стандартним" інтеркалятором в дослідженнях, пов'язаних з нуклеїновими кислотами.

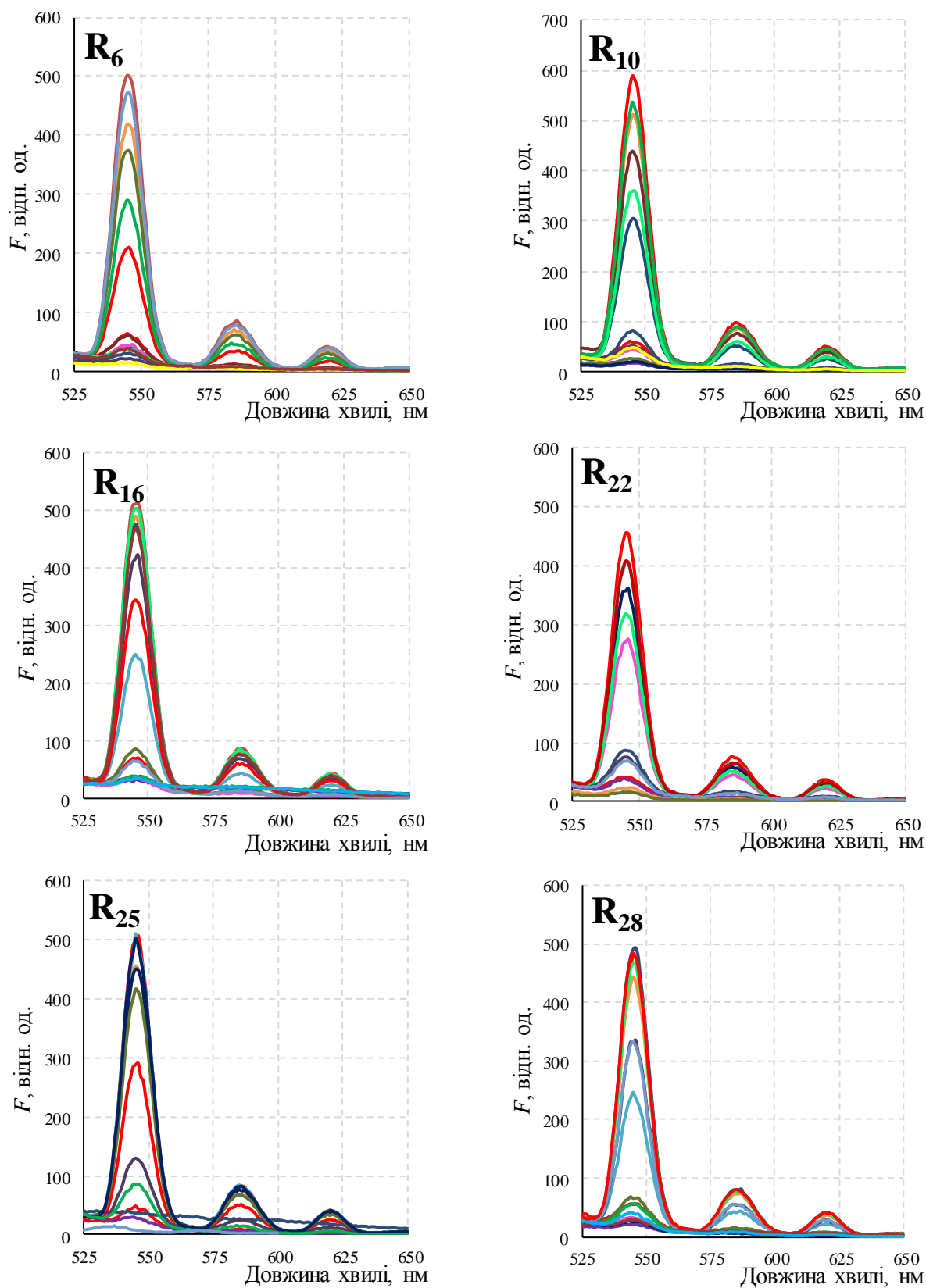


Рисунок 3.14 – Спектри люмінесценції інтеркальованого зонда Tb(III)-L₂ ($C_{\text{Tb}} = C_{\text{L}_2} = 1,0 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ДНК}} = 1,0$ мкг/мл) у присутності змінних концентрацій реагентів R_{6,10,16,22,25,28}

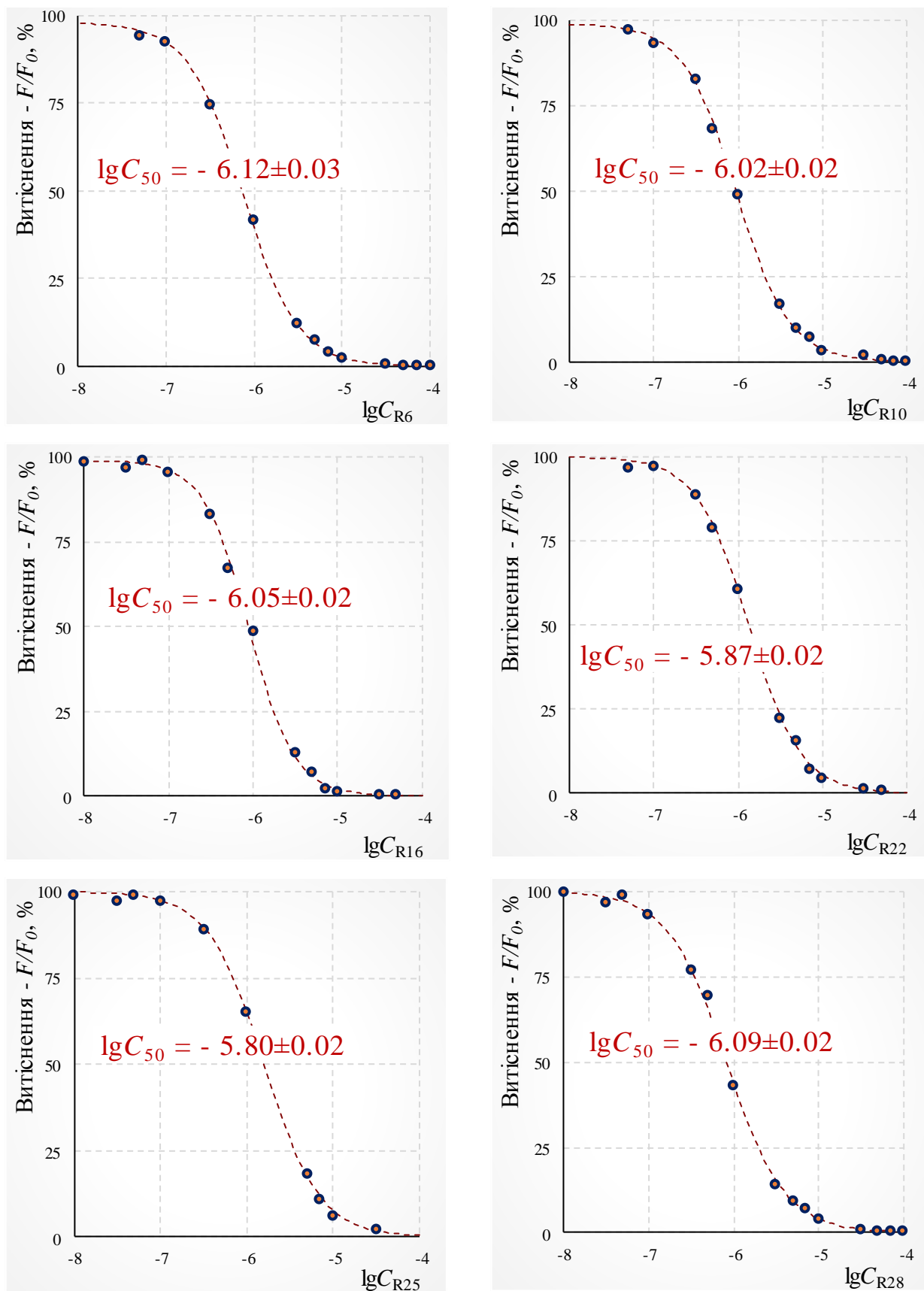
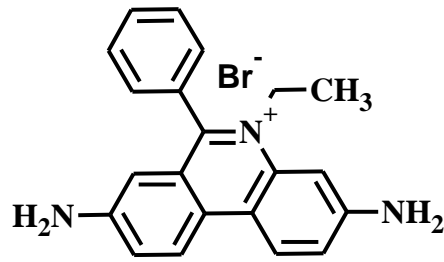


Рисунок 3.15 – Криві витіснення реагентами $R_{6,10,16,22,25,28}$ зонда $Tb(III)-L_2$ з його сполуки з ДНК

Структурна формула ЕБ:



Спектр поглинання ЕБ у водному розчині характеризується наявністю смуг в ультрафіолетовій області спектра (рисунок 3.16) з високими молярними коефіцієнтами поглинання (ϵ): $\epsilon_{334} = 5100 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$; $\epsilon_{293} = 19900 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, що вказує на ефективне поглинання їм світлової енергії.

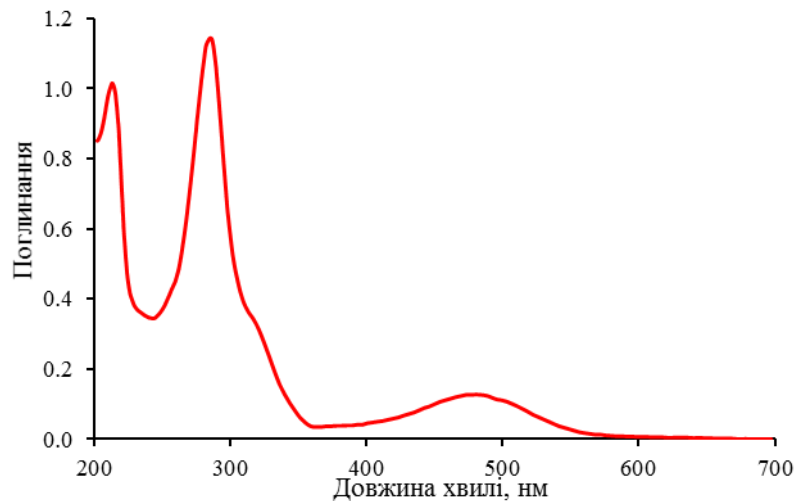


Рисунок 3.16 – Спектр поглинання ЕБ ($C = 1 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$; $l = 1 \text{ см}$)

При освітленні ультрафіолетовим світлом ЕБ дуже слабо флуоресцює оранжевим кольором ($\lambda_{\text{макс}} = 611 \pm 2 \text{ нм}$), інтенсивність флуоресценції збільшується приблизно в 500 разів при зв'язуванні з ДНК.

Якщо досліджувана речовина є інтеркалятором, то конкуренція його з етидію бромідом призводить до витіснення останнього і, як наслідок, до зниження інтенсивності флуоресценції, причому, чим сильнішим інтеркалятором є досліджуваний препарат, тим більшою мірою проявляються ці ефекти за інших рівних умов. Для жодного з вивчених лігандів не спостерігалось гасіння флуоресценції в такій мірі, щоб

спотворення результатів вивчення витіснення етидію броміду було значним. У зв'язку з цим експеримент проводили методом Antonini [172].

Методика

В ряд мірних колб об'ємом 10.0 мл вносили по 5,0 мл *контрольного розчину для вивчення витіснення* (розчин "F") і по 0; 0.05; 0.10; 0.50; 1.00 робочого розчину ліганда ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 0.30; 0.50; 0.70 1.00 мл робочого розчину ліганда ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); 0.30; 0.50; 0.70 1.00 мл робочого розчину ліганда ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л); 0.50; 1.00; 5.00 мл робочого розчину ліганда ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), доводили розчини до 10.0 мл водою і перемішували. За 5 хвилин вимірювали F при $\lambda_{\text{еміс}} = 611$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 300$ нм).

Спектри флуоресценції, отримані в методі флуоресцентного титрування ДНК-ЕБ деякими алкіламіноалкоксипохідними 2,7-діоксифлуорена, представлено на рисунку 3.17. Збільшення концентрації АФ призводить до гасіння флуоресценції зонда, що свідчить про збільшення частки зв'язування АФ з ДНК. Розраховані значення логарифмів констант зв'язування представлено в таблиці 3.5.

Відповідні залежності витіснення від $\lg C_R$ представлено на рисунку 3.18, з яких розраховували значення $\lg C_{50}$, а потім – значення $\lg K_A$ за формулою (3.2) [174]:

$$\lg K_A = \lg C_{EB} - \lg C_{50} + \lg K_{EB}, \quad (3.2)$$

де:

K_A – константа асоціації з ДНК досліджуваного речовини,

K_{EB} – константа асоціації ДНК з ЕБ ($\lg K_{EB} = 7$),

C_{50} – концентрація досліджуваного ліганда, що призводить до 50%-го зниження інтенсивності флуоресценції,

C_{EB} – аналітична концентрація етидію броміду, що застосовувалася в експерименті.

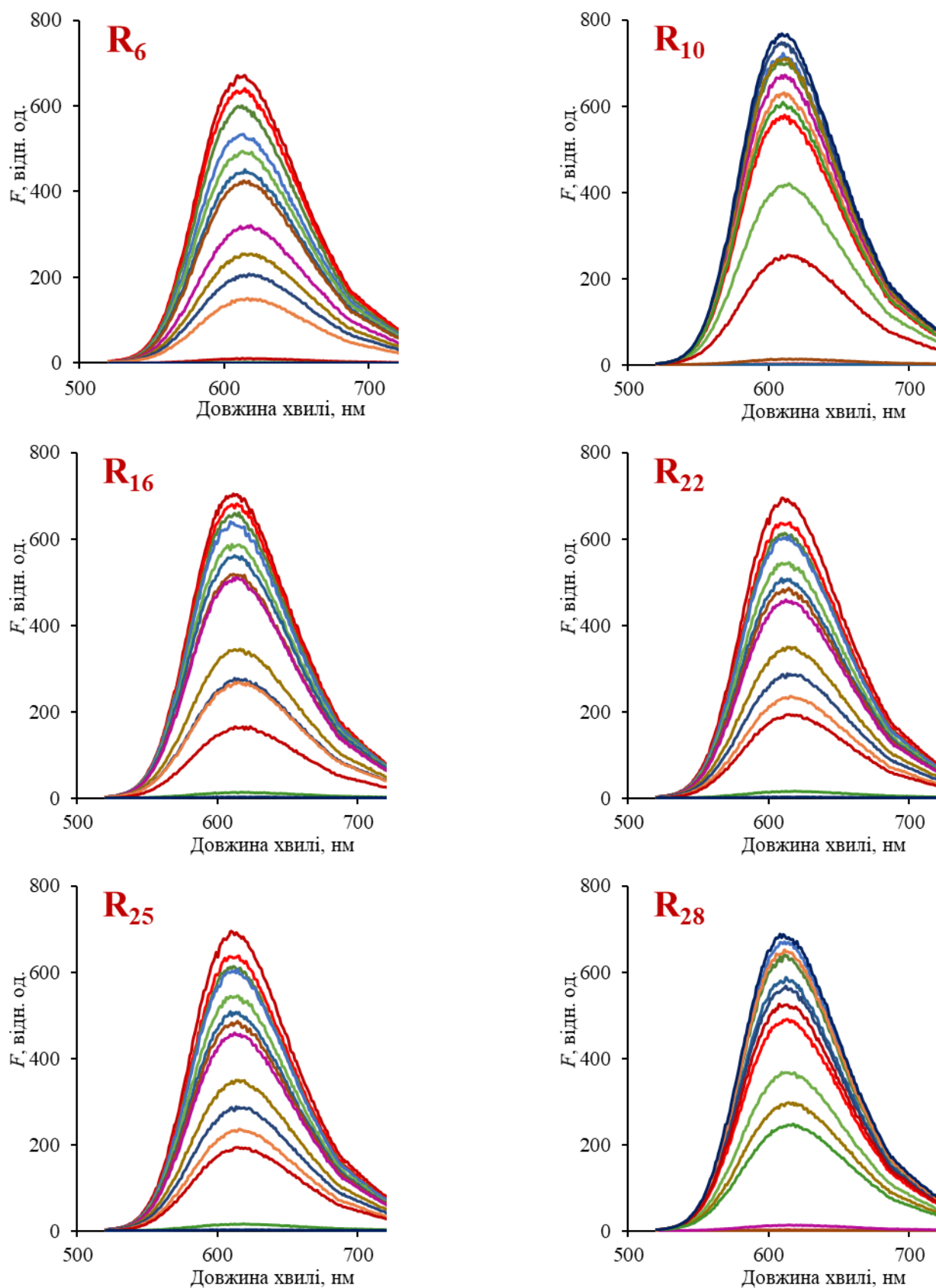


Рисунок 3.17 – Спектри флуоресценції інтеркальованого етидію броміду ($C_{\text{ЕБ}} = 1,27 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ДНК}} = 1,06 \cdot 10^{-5}$ моль/л) в присутності змінних концентрацій $C_{\text{R6, 10, 16, 22, 25, 28}}$ ($5 \cdot 10^{-8}$ моль/л – $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л)

Усі сполуки близькі за значенням констант асоціації ($\lg K_x = 6,36 - 7,15$), які характерні для інтеркаляторів ДНК (таблиця 3.5).

Як видно з таблиці 3.5, значення логарифмів констант зв'язування, отримані за допомогою ЕБ і Тв(III)-L2, задовільно узгоджуються.

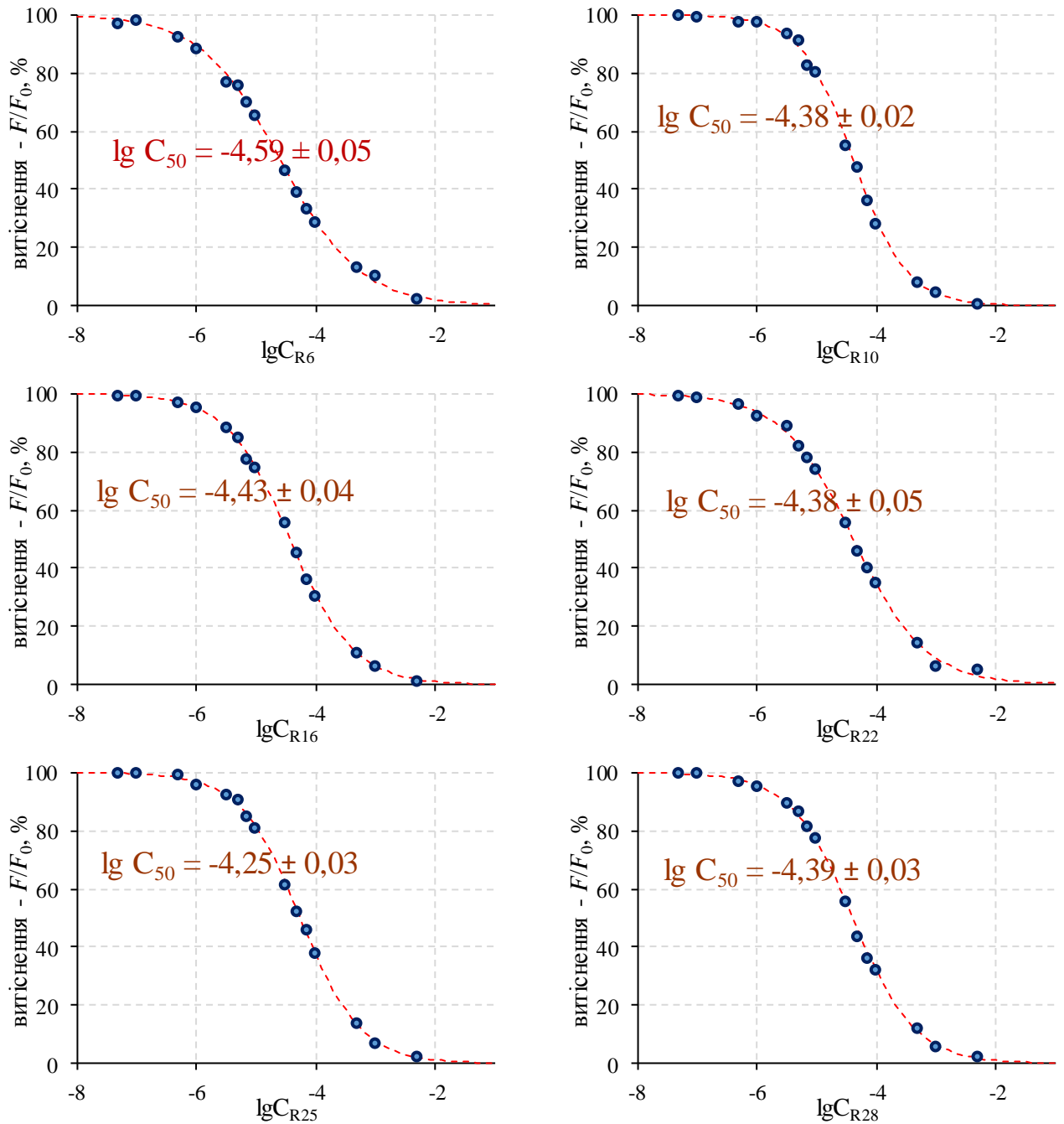


Рисунок 3.18 – Криві витіснення деякими лігандами ($R_6, R_{10}, R_{16}, R_{22}, R_{25}, R_{28}$) ЕБ з його сполуки з ДНК

Таблиця 3.5

Логарифми констант зв'язування деяких похідних АФ з ДНК

№R	Логарифми констант зв'язування	
	розраховані по ЕБ	розраховані по Tb(III)-L ₂
R ₄	6,41	6,21
R ₅	6,58	6,44
R ₆	6,69	6,54
R ₁₆	6,53	6,47
R ₂₅	6,36	6,22
R ₂₈	6,49	6,50

Статистичним методом двохфакторного дисперсійного аналізу проведено порівняння результатів за F -критерієм. Розбіжність між величинами констант, отриманих двома методами, є незначною на рівні 99%-ої ймовірності (таблиця 3.6).

Таблиця 3.6

Порівняння логарифмів констант зв'язування деяких АФ з ДНК, отриманих різними методами

Джерело варіації	Сума квадратів відхилень	ступені свободи	оцінка дисперсії	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{крит.}}$ для $P = 99\%$
за зонду (ЭБ/Tb(III) – L ₂)	0,039	1	0,039	13,6	16,3
за реагенту (R)	0,161	5	0,032	11,4	11,0
залишкова	0,014	5	0,003		
загальна	0,214	11	0,019		

Оскільки величина IgK характеризує ступінь взаємодії лікарських препаратів з молекулами ДНК, то в ряді близьких за структурою біологічно активних речовин можна використовувати запропонований лантанідний зонд.

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

Отримані значення констант зв'язування при взаємодії похідних АФ з ДНК підтверджують той факт, що проявляється як інтеркаляційне зв'язування, так і кооперативне (електростатичне) приєднання по фосфатним групам ДНК, а також взаємодія по жолобу, залежне від довжини ланцюга бічних заступників.

Всі сполуки близькі за значеннями констант асоціації ($\lg K = 6,21 - 7,15$), які характерні для інтеркаляторів ДНК (таблиця 3.9). На підставі отриманих даних проведено аналіз впливу варіації регульованих факторів (таблиця 3.7) (кількість метиленових ланок у ланцюзі лінкера та природа термінальної групи) на варіацію результативної ознаки – зміни константи зв'язування досліджуваних сполук з нуклеїновими кислотами за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) [173,174]. Формули для проведення двофакторного дисперсійного аналізу наведено у таблиці 3.8.

Таблиця 3.7

Регульовані фактори впливу на варіацію констант зв'язування АФ з ДНК

Фактор А	Фактор В	Число варіацій фактора А	Число варіацій фактора В
Кількість метиленових ланок в бічних ланцюгах	Природа термінальної групи	$k = 3$	$m = 10$

Таблиця 3.8

Формули для проведення двофакторного дисперсійного аналізу

Компонента дисперсії	Сума квадратів відхилень	Число ступенів свободи	Оцінка дисперсії
по фактору А	$Q_A = m \sum_j^k (\bar{x}_j^A - \bar{x})^2$	$k - 1$	$s_A^2 = \frac{Q_A}{k - 1}$
по фактору В	$Q_B = k \sum_i^m (\bar{x}_i^B - \bar{x})^2$	$m - 1$	$s_B^2 = \frac{Q_B}{m - 1}$
залишкова	$Q_E = \sum_i^m \sum_j^k (x_{ij} - \bar{x}_j^A - \bar{x}_i^B + \bar{x})^2$	$(k - 1) \cdot (m - 1)$	$s_E^2 = \frac{Q_E}{(k - 1)(m - 1)}$

Таблиця 3.9

Логарифми констант зв'язування алкіламіноалкоксифлуоренонів з ДНК,
розраховані за гасінням зонда Tb(III)-L₂

Варіація фактору В (термінальна група)		Варіація фактору А (кількість метиленових ланок у бічних ланцюгах)			Середнє (внесок фактору В) \bar{X}_i^B
		A ₁ етокси	A ₂ пропокси	A ₃ бутокси	
1		2	3	4	5
B ₁		6,58	6,62	6,75	6,65
B ₂		6,41	6,58	6,21	6,40
B ₃		6,87	6,99	7,15	7,00
B ₄		6,44	6,64	6,95	6,68
B ₅		6,49	6,65	7,01	6,72
B ₆		6,54	6,67	6,82	6,68
B ₇		6,51	6,80	6,98	6,76
B ₈		6,47	6,53	6,61	6,54
B ₉		6,22	6,52	6,87	6,54
B ₁₀		6,50	6,63	6,93	6,69
Середнє (внесок фактору А), \bar{X}_i^A		6,50	6,66	6,83	6,67

Таблиця 3.10

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			

Результати проведення дисперсійного аналізу впливу структури алкіламіноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренона-9 на афінитет до ДНК наведено у таблиці 3.10.

Розраховано дисперсійні відносини ($F_{\text{факт}}$) для фактору А (кількість метиленових ланок в бічних ланцюгах) і фактору В (природа термінальної групи) набагато перевершують відповідні квантільне значення F -розподілу, які визначено для 99%-го довірчого рівня. Таким чином, вплив варіацій факторів А і В на зміну результативної ознаки (зв'язування з ДНК) є статистично значущим на високому рівні довірчої ймовірності.

Надалі можна оцінити силу впливу вкладів варіацій факторів на досліджувану ознаку [174]:

– внесок фактору А розраховували за формулою:

$$h_A = \frac{Q_A}{Q} \cdot 100\% = \frac{0.645}{1.226} \cdot 100\% = 52.6\% ;$$

– внесок фактору В розраховували за формулою:

$$h_B = \frac{Q_B}{Q} \cdot 100\% = \frac{0.470}{1.226} \cdot 100\% = 38.3\% ;$$

– внесок неврахованих факторів і випадкових відхилень розраховували за формулою:

$$h_E = \frac{Q_E}{Q} \cdot 100\% = \frac{0.110}{1.226} \cdot 100\% = 9.1\%$$

Оцінка впливу варіацій факторів, що впливають на зміну досліджуваної ознаки (зв'язування з ДНК) представлено на рисунку 3.19.

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



Рисунок 3.19 – Діаграма внесків факторів, що впливають на зміну досліджуваної ознаки (зв'язування з ДНК)

3.4 Визначення ДНК у модельних розчинах

При додаванні розчину ДНК до комплексу Tb(III)-L₂ відбувається різке збільшення інтенсивності люмінесценції в порівнянні з інтенсивністю люмінесценції подвійного комплексу (рисунок 3.20, а). В спектрах збудження комплексу Tb(III)-L₂ в присутності ДНК спостерігається зсув на ~ 10 нм в довгохвильову область спектра (рисунок 3.20, б). Це може служити підтвердженням взаємодії в системах Tb(III)-L₂ з молекулами ДНК.

Як видно з рисунку 3.21, лінійна залежність інтенсивності люмінесценції

комплексу Tb(III)-L₂ від концентрації ДНК спостерігаються в інтервалі 0.1 – 1.0 мкг/мл. Межа виявлення ДНК становить 30 нг/мл.

Градувальний графік

В ряд мірних колб об'ємом 10.0 мл вносили по 0.10; 0.30; 0.50; 0.70; 1.00 мл робочого розчину ДНК (10 мкг/мл). У кожну колбу додавали по 1.0 мл 1·10⁻⁵ моль/л розчину хлориду тербію, 1.0 мл 1·10⁻⁵ моль/л розчину L₂, 0.4 мл 40%-го розчину уротропіну. Паралельно готували розчин контрольної проби, який містить всі компоненти, крім ДНК. Розчини доводили до 10.0 мл водою та перемішували. За 5 хвилин вимірювали F при $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 245$ нм).

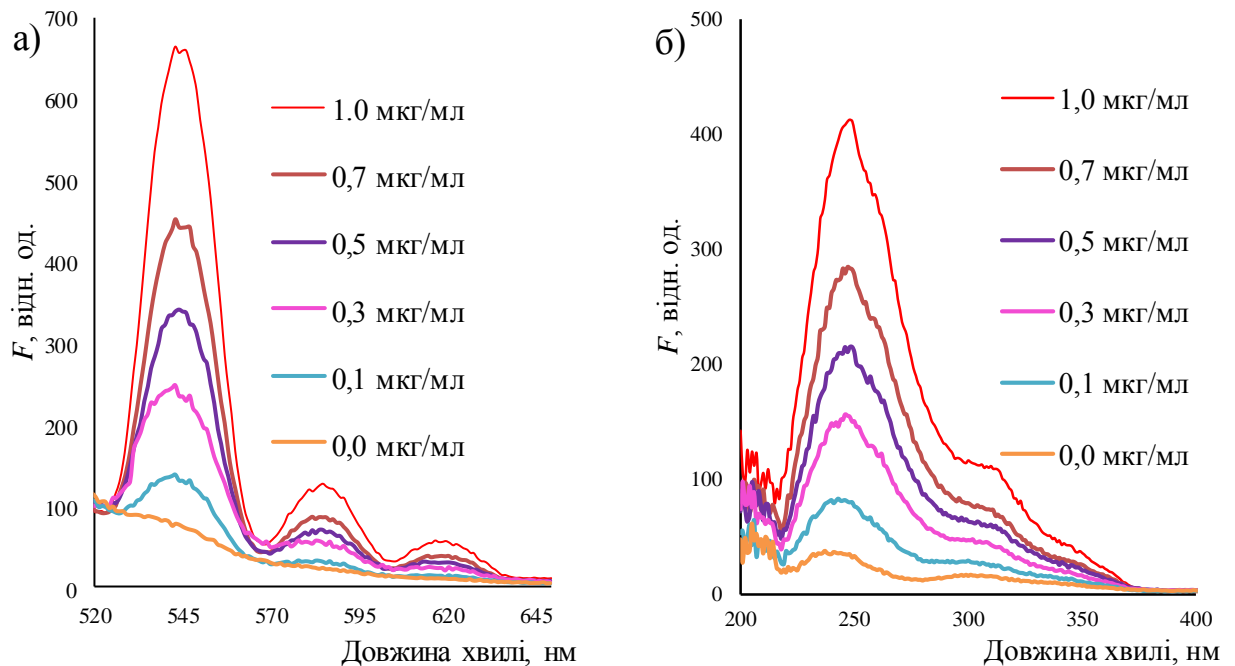


Рисунок 3.20 – Спектри люмінесценції (а) і збудження (б) комплексу Tb(III)-L₂ в присутності різних концентрацій ДНК ($C_{\text{Tb}}=C_{\text{L}_2}=1\cdot 10^{-6}$ моль/л; $\lambda_{\text{еміс}} = 545$ нм; $\lambda_{\text{збуд}} = 245$ нм)

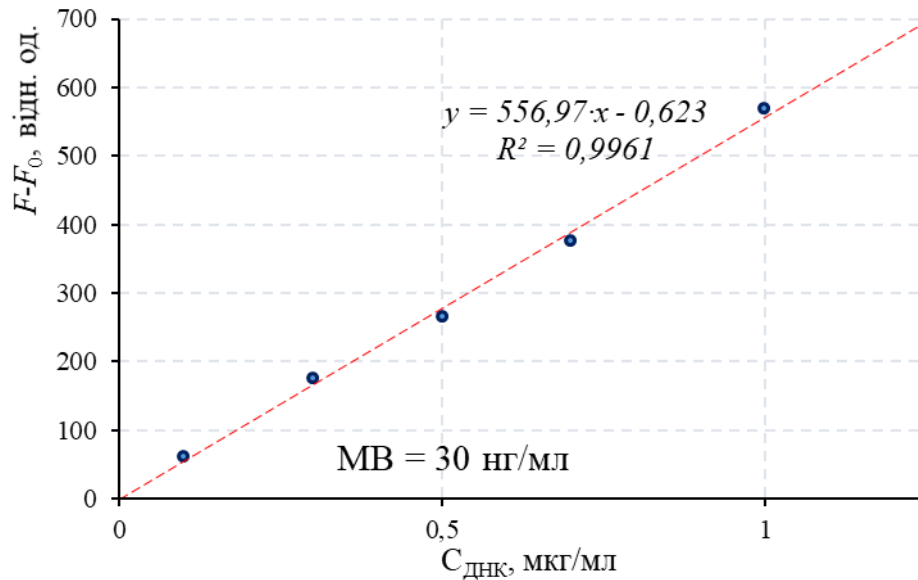


Рисунок 3.21 – Градувальний графік для визначення ДНК ($C_{\text{ТЬ}} = C_{L2} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; $C_{\text{ДНК}} = 0.1 - 1.0$ мкг/мл)

Хід аналізу

У мірні колби об'ємом 10 мл вносять по 0.1; 0.2; 0.3 мл робочого розчину ДНК (10 мкг/мл) (3 паралельних вимірювання). У кожену колбу додають по 1,0 мл робочих розчинів хлоридів калію, натрію, кальцію та глюкози ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); по 0.5 мл робочого розчину L-аланіну ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Далі додають всі реактиви та проводять вимірювання як при побудові градувального графіка.

Результати визначення ДНК в модельних розчинах представлено в таблиці 3.11. Запропонована методика характеризується задовільними метрологічними характеристиками та простотою виконання.

Таблиця 3.11

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_f	Відкриваємість, %	δ , %
САЛ, Na^+ ,	0.100	0.101 ± 0.013	0.051	101.0	1.0
K^+ , Ca^{2+} ,	0.200	0.197 ± 0.021	0.042	98.5	1.5
глюкоза,	0.300	0.302 ± 0.039	0.052	100.7	0.7
L-аланін					

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

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

Висновки до розділу 3

1. Вивчено спектральні характеристики деяких аміноалкоксифлуоренонів у водних розчинах та похідних 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти. Визначено спектрально-люмінесцентні характеристики комплексів іонів Tb(III) з похідними 2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонової кислоти. Показано, що при додаванні розчину ДНК до деяких комплексам Tb(III)-L відбувається збільшення інтенсивності люмінесценції. Комплекс Tb(III)-L₂ запропановано в якості нового люмінесцентного зонду для дослідження інтеркаляції ДНК.
2. Методом конкуренції з новим лантанідним зондом показано, що всі синтезовані аміноалкоксифлуоренони є інтеркаляторами ДНК, визначено логарифми констант асоціації синтезованих сполук з ДНК.
3. Проведено аналіз впливу будови аміноалкоксипохідних 2,7-діоксифлуоренона (кількість метиленових ланок у ланцюзі лінкера та природа термінальної групи) на зміну константи зв'язування досліджуваних сполук з ДНК за допомогою дисперсійного аналізу. Встановлено, що зміна кількості метиленових ланок у ланцюзі лінкера в бічному фрагменті АФ призводить до достовірної зміни афінитету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК.
4. Показано, що люмінесцентний зонд Tb(III)-L₂ можна рекомендувати для високочутливого визначення ДНК, а також для вивчення зв'язування противірусних лікарських речовин з молекулами ДНК.

РОЗДІЛ 4

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ З СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ ЛЮДИНИ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ

Аналітична хімія (зокрема, люмінесцентний аналіз) у застосуванні до біохімічних і фармацевтичних завдань дозволяє встановити як сам факт взаємодії «малих молекул» (в тому числі ксенобіотиків, лікарських препаратів) з протеїнами (найчастіше з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) або сироватковим альбуміном людини (САЛ)), так і охарактеризувати природу цієї взаємодії (визначити відстані між донором і акцептором, константи зв'язування, з'ясувати характер сил зв'язування), висловити припущення про місця зв'язування (у чому велику допомогу може надати молекулярний докінг).

Для вивчення взаємодії САЛ з ЛР в роботі розглянуто наступні препарати: гідазепам (ГІД), феназепам (ФЕН), діазепам (ДЗП), левана (ЛЕВ), пропоксазепам (ПРП), мориноксин (МОР), тилорон (ТИЛ), долутегравір натрію (ДН), софосбувір (СОФ), індометацин (ІНД), даклатасвіру дигідрохлорид (ДАК).

4.1 Електронні спектри поглинання

Абсорбційна спектроскопія є простим та зручним методом, який використовується для дослідження структурних змін та вивчення різних видів взаємодії [175].

Як приклад на рисунках 4.1 – 4.5 представлено спектри поглинання низки бенздіазепінів (БД) та спектри поглинання деяких противірусних ЛР (рисунки 4.6 – 4.8).

У спектрах поглинання похідних бенздіазепінів (БД) спостерігаються два піки з максимумами при: 231 нм і 309 нм (ГІД); 231 нм і 317 нм (ФЕН); 233 нм і 318 нм (ПРП); 286 нм і 361 нм (ДЗП), 233 нм і 322 нм (ЛЕВ). У спектрах деяких противірусних ЛР спостерігаються піки з максимумами

при: 270 нм (ТИЛ); 220 нм, 270 нм і 356 нм (МОР); 225 нм (ДН). Для початкової перевірки механізму гасіння вимірювали та реєстрували спектри УФ-поглинання (САЛ) та ((САЛ + ЛР) – ЛР). САЛ має два максимуми поглинання при довжинах хвиль 220 нм і 280 нм. Інтенсивний сигнал близько 220 нм відповідає поглинанню основного ланцюгу САЛ, тоді як слабкий сигнал близько 280 нм обумовлений поглинанням ароматичних амінокислот триптофану (Трп), тирозину (Тир) і фенілаланіну (Фен). При додаванні ЛР інтенсивність піку при 220 нм зменшується з батохромним зміщенням приблизно на 2 – 9 нм, що вказує на зміну в мікрооточенні навколо амідних зв'язків у білку, що підтверджує наявність взаємодії між ЛР і САЛ в основному стані.

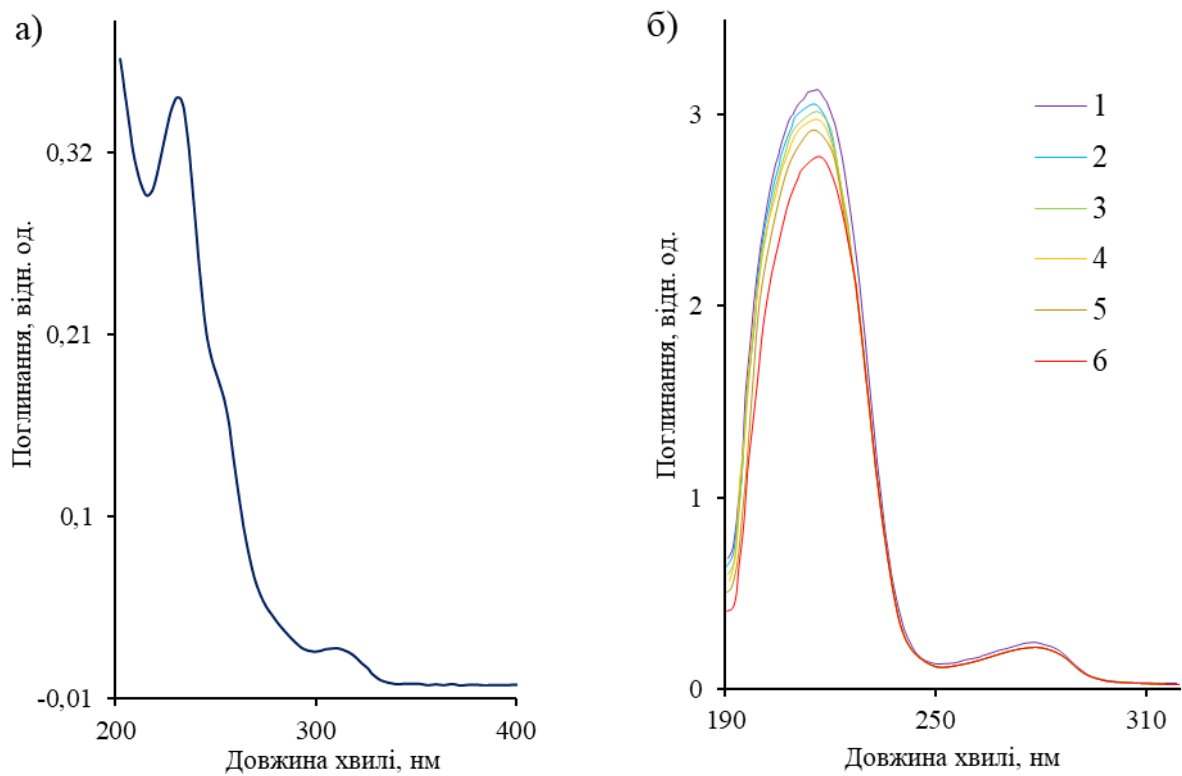


Рисунок 4.1 – Спектр поглинання ГІД ($C_{\text{ГІД}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ГІД на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ГІД}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2 – 6 – різницевий спектр поглинання між ГІД + САЛ і ГІД)

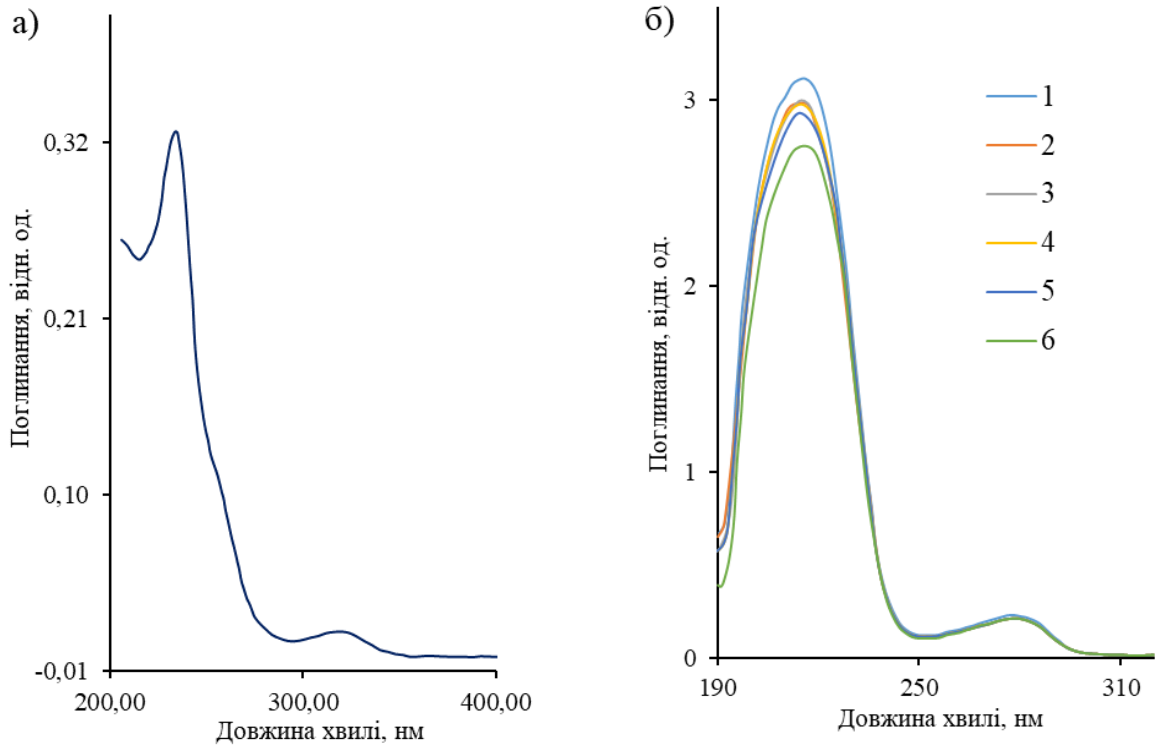


Рисунок 4.2 – Спектр поглинання ФЕН ($C_{\text{ФЕН}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ФЕН на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ФЕН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ФЕН + САЛ і ФЕН)

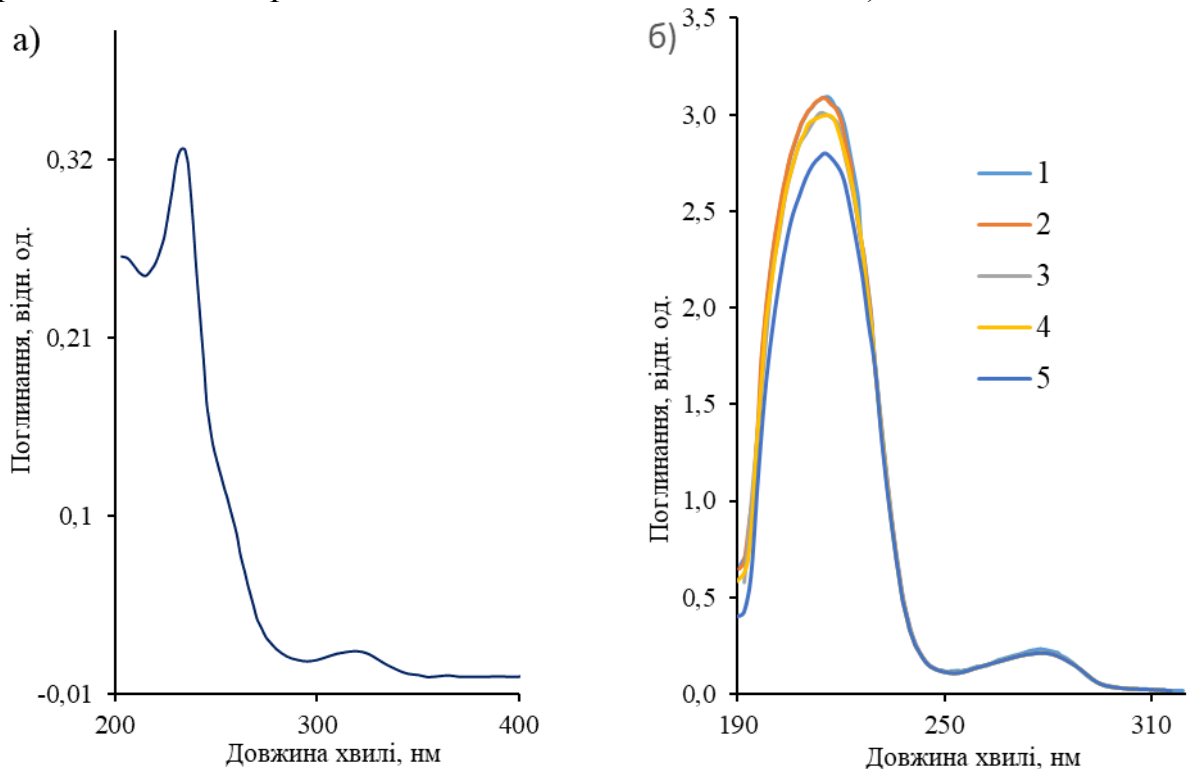


Рисунок 4.3 – Спектр поглинання ПРП ($C_{\text{ПРП}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ПРП на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ПРП}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ПРП + САЛ і ПРП)

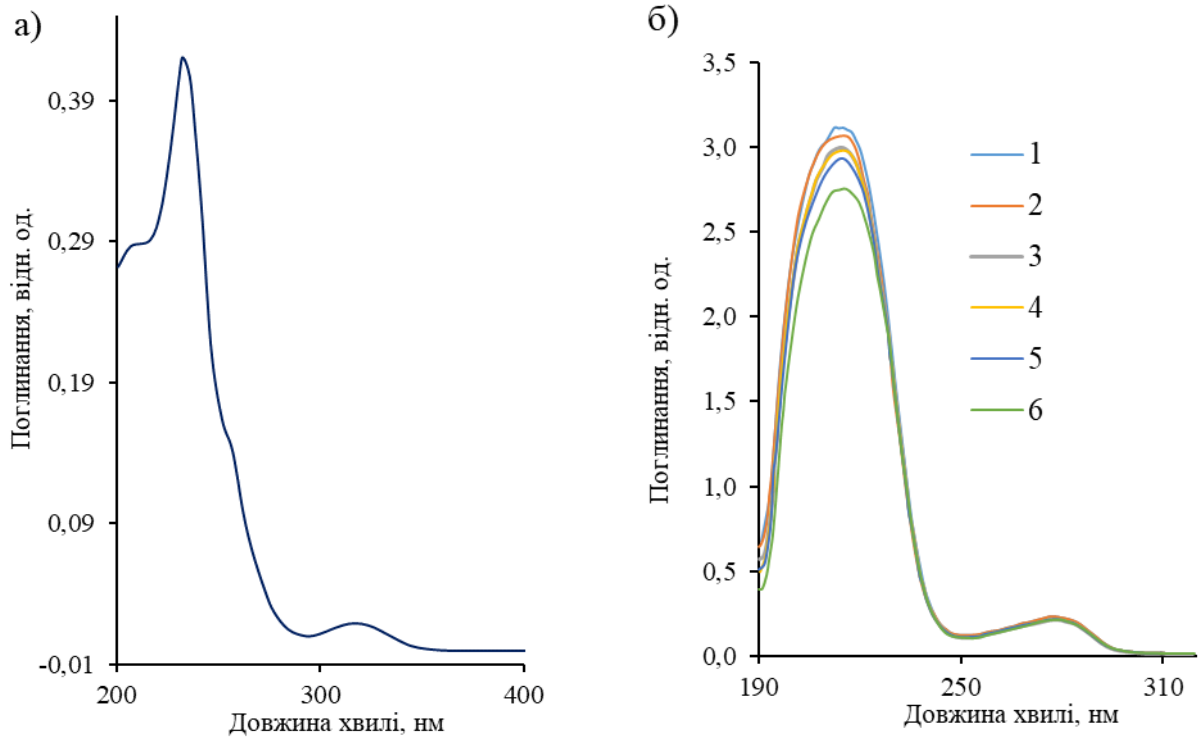


Рисунок 4.4 – Спектр поглинання ЛЕВ ($C_{\text{ЛЕВ}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ЛЕВ на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ЛЕВ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ЛЕВ + САЛ і ЛЕВ)

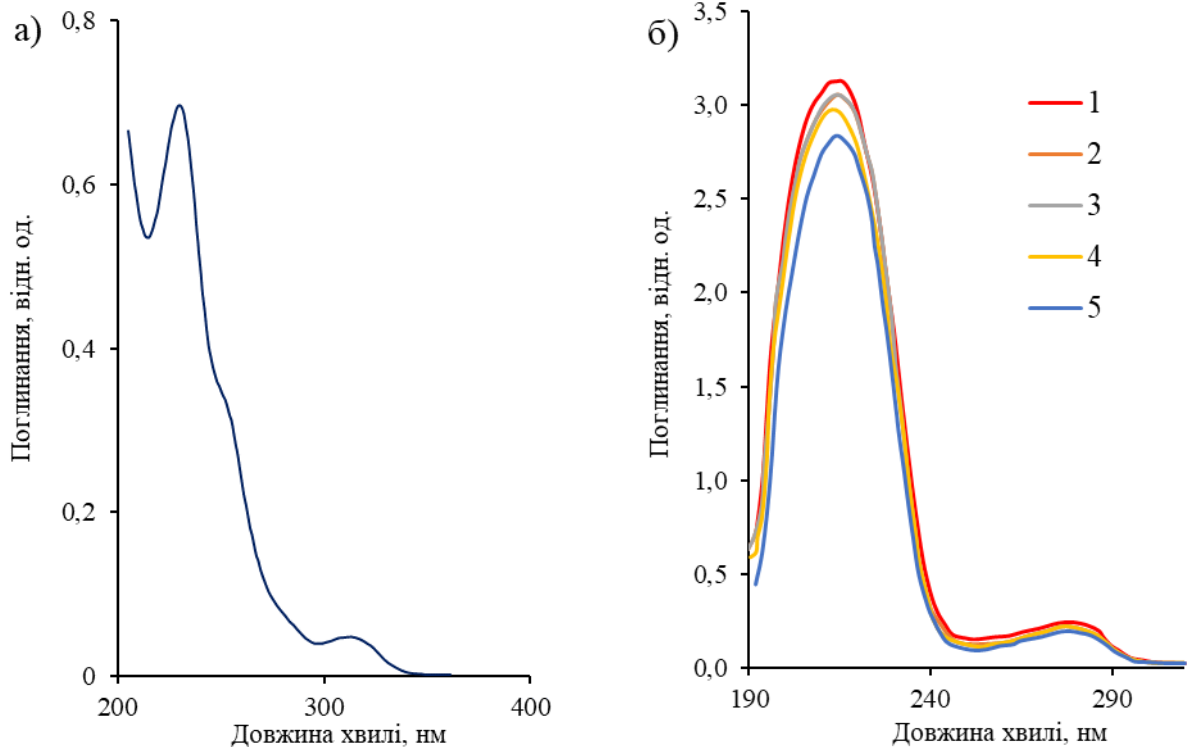


Рисунок 4.5 – Спектр поглинання ДЗП ($C_{\text{ДЗП}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ДЗП на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ДЗП}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ДЗП + САЛ і ДЗП)

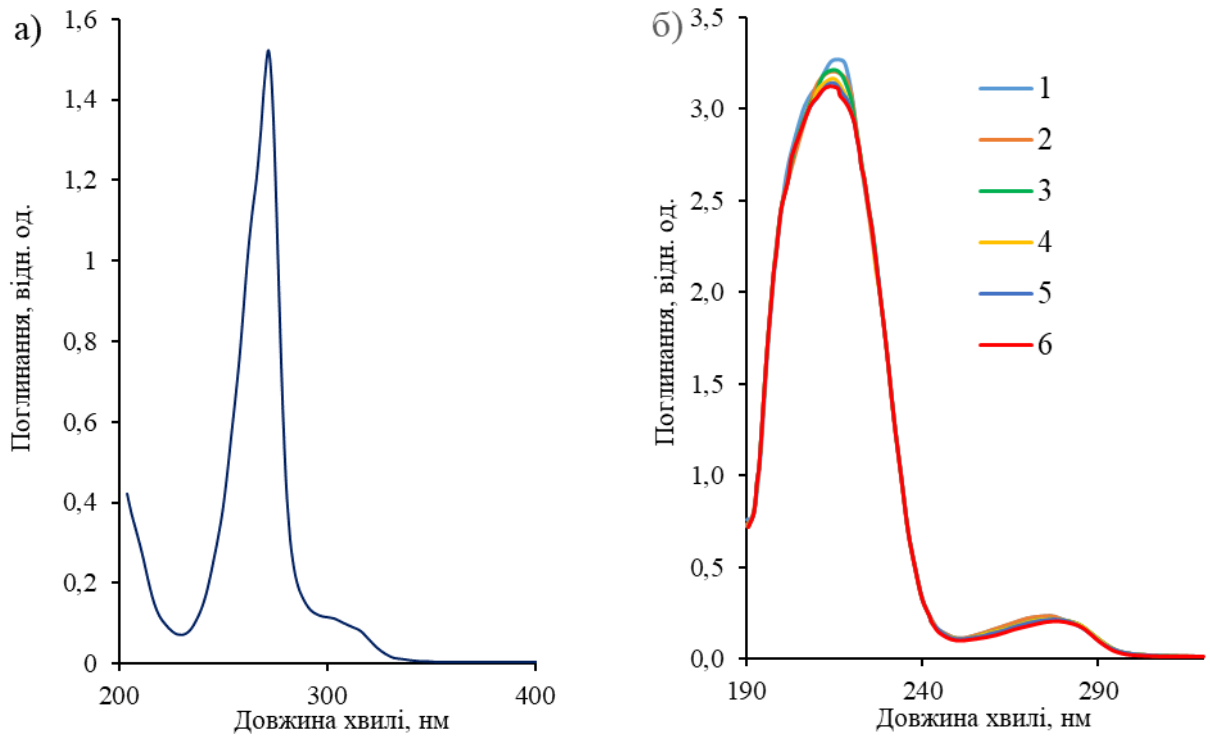


Рисунок 4.6 – Спектр поглинання ТІЛ ($C_{\text{ТІЛ}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ТІЛ на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ТІЛ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ТІЛ + САЛ і ТІЛ)

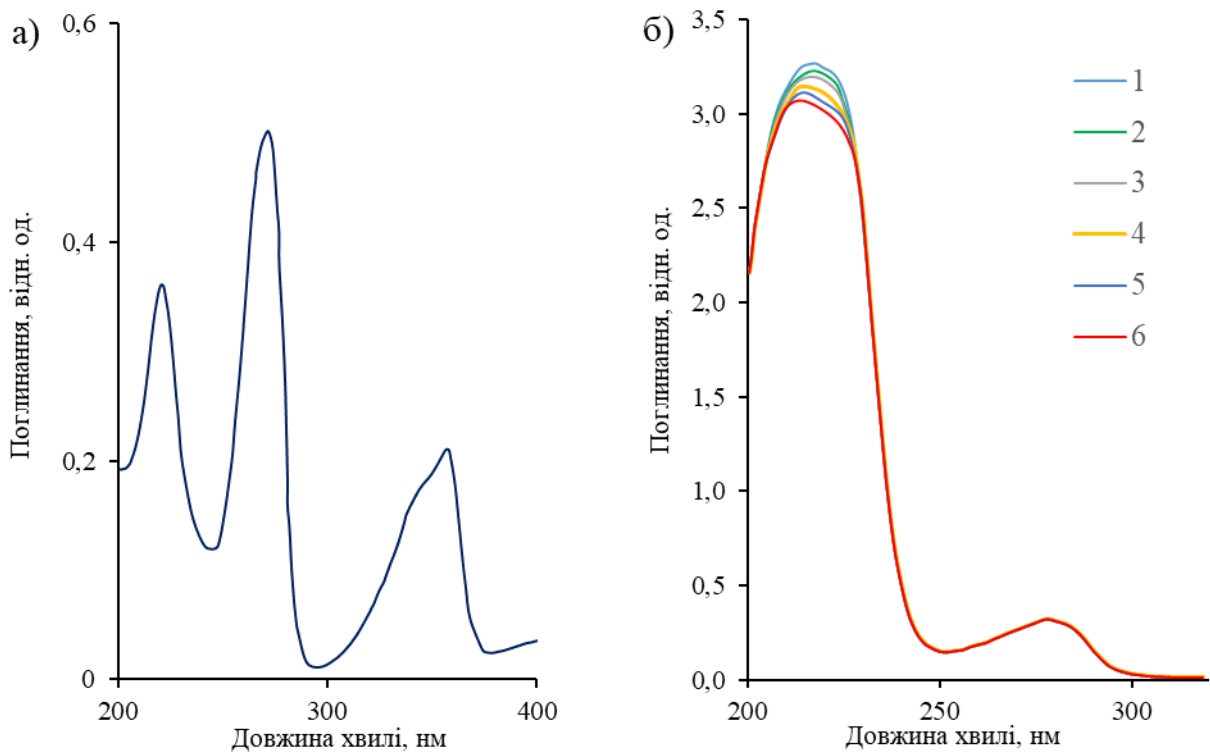


Рисунок 4.7 – Спектр поглинання МОР ($C_{\text{МОР}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив МОР на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{МОР}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між МОР + САЛ и МОР)

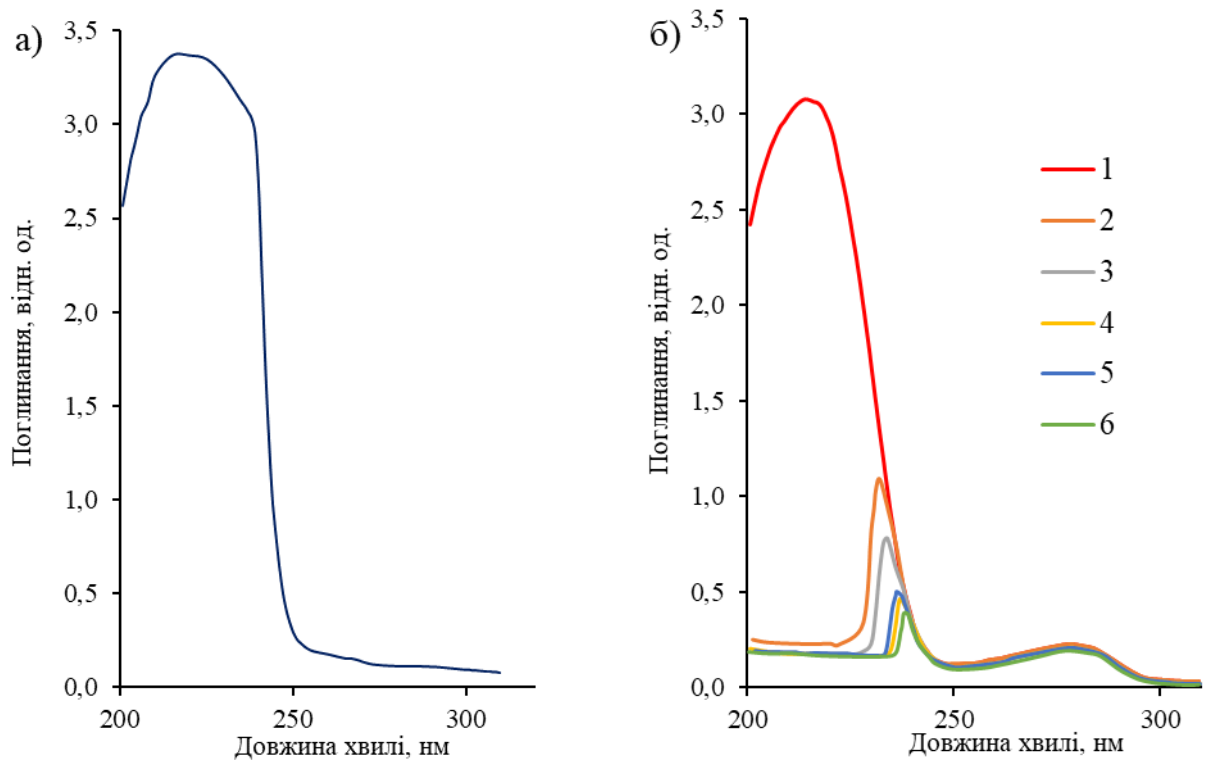


Рисунок 4.8 – Спектр поглинання ДН ($C_{\text{ДН}} = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (а); вплив ДН на УФ-спектри поглинання САЛ (б) ($T = 298$ К, $\text{pH} 7,5$, $C_{\text{САЛ}} = 5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{\text{ДН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, 1-6: 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 (2-6 – різницевий спектр поглинання між ДН + САЛ і ДН)

4.2 Гасіння флуоресценції

Взаємодію ЛР з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка (гасіння) при додаванні ЛР (рисунки 4.9 – 4.13). Емісія САЛ характеризується широкою смугою за довжини хвилі 346 нм. При збільшенні концентрації ЛР інтенсивність флуоресценції САЛ помітно зменшується. Аналіз зміни емісії САЛ за різних концентрацій ЛР проводився за рівнянням Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{SV}} \cdot [L] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [L] \quad (4.1)$$

де: F_0 – інтенсивність флуоресценції у відсутності гасників;

F – інтенсивність флуоресценції у присутності гасників;

$[L]$ – концентрація гасників;

k_q – константа швидкості гасіння для бімолекулярної реакції;

K_{SV} – константа гасіння Штерна-Фольмера;

τ_0 – середній час життя збудженого стану флуорофора за відсутності гасників, оцінений у 10^{-8} с.

Методика

Випробуваний розчин. В ряд мірних колб місткістю 10,0 мл вносять відповідні об'єми вихідного розчину РСЗ ЛР, додають необхідний об'єм стандартного розчину САЛ (10^{-4} моль/л) і 1,0 мл трис-НСІ буферного розчину рН 7,5, доводять водою до позначки і перемішують. За 5 хвилин вимірюють F при $\lambda_{\text{еміс}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм).

Розчин порівняння. 1,0 мл трис-НСІ буферного розчину рН 7,5 і необхідний об'єм стандартного розчину САЛ (10^{-4} моль/л) поміщають в мірну колбу місткістю 10,0 мл, доводять об'єм розчину водою до позначки і перемішують. За 5 хвилин вимірюють F при $\lambda_{\text{еміс}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм).

На рисунках 4.14 – 4.18 представлено графіки залежності F_0/F від концентрації деяких ЛР при різних температурах. Вони демонструють задовільні лінійні кореляції, з яких встановлено константи гасіння Штерна-Фольмера (K_{SV}) (таблиця 4.1).

Процес гасіння зазвичай може бути викликаний процесом зіткнення і / або утворенням адукту між флуорофором і гасником. Величини констант швидкості гасіння в таблиці 4.1 мають розмірність 10^{12} л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$. Очевидно, що константа швидкості гасіння k_q для БД-САЛ є більшою, ніж константа дифузії біополімерів 10^{10} л·моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$, яка лімітує швидкість зіткнень. Це вказує на те, що дане гасіння флуоресценції САЛ не викликано динамічним зіткненням, а відбувається внаслідок утворення сполуки з БД, що можна віднести до статичного гасіння (підтверджується результатами дослідження спектрів поглинання). Крім того, лінійність графіків Штерна-Фольмера вказує на існування одного типу гасіння.

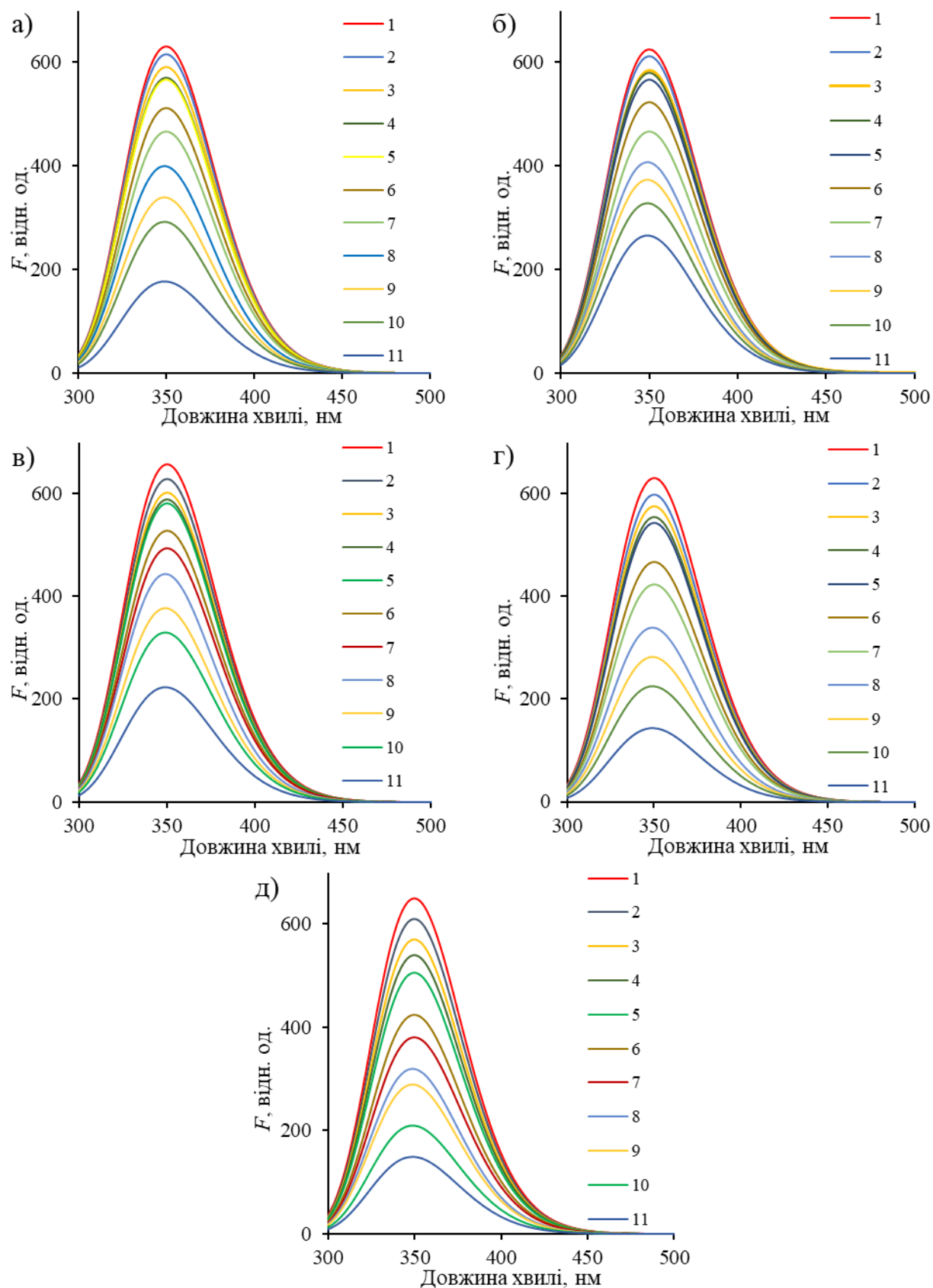


Рисунок 4.9 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей БД: ГІД (а), ФЕН (б), ПРП (в), ЛЕВ (г) и ДЗП (д) ($C_{\text{БД}} \cdot 10^{-6}$ моль/л, криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К)

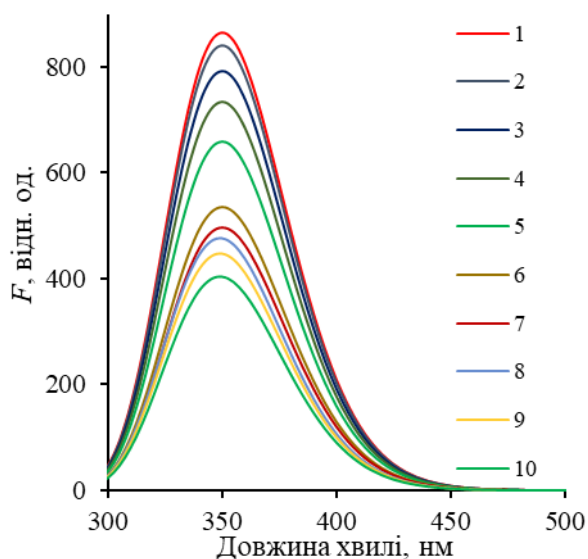


Рисунок 4.10 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей ТИЛ ($C_{\text{ТИЛ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 10): 0, 1,0, 2,0, 5,0, 7,0, 10,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, рН 7,4, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К)

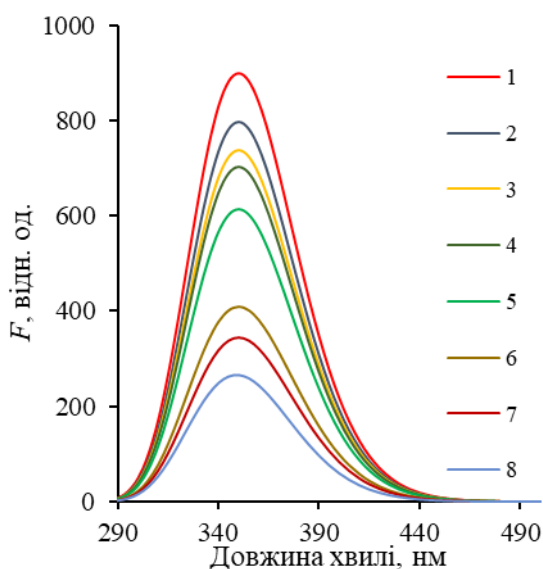


Рисунок 4.11 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей МОР ($C_{\text{МОР}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 8): 0, 0,81, 1,35, 1,89, 2,70, 5,40, 8,10, 10,8; рН 7,4, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К)

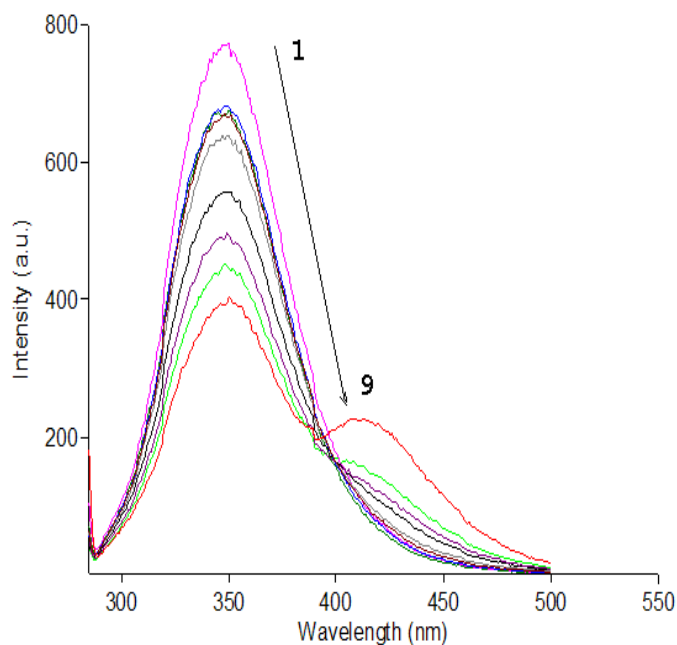


Рисунок 4.12 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей ДН ($C_{\text{ДН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 9): 0, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 70, рН 7,5, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К)

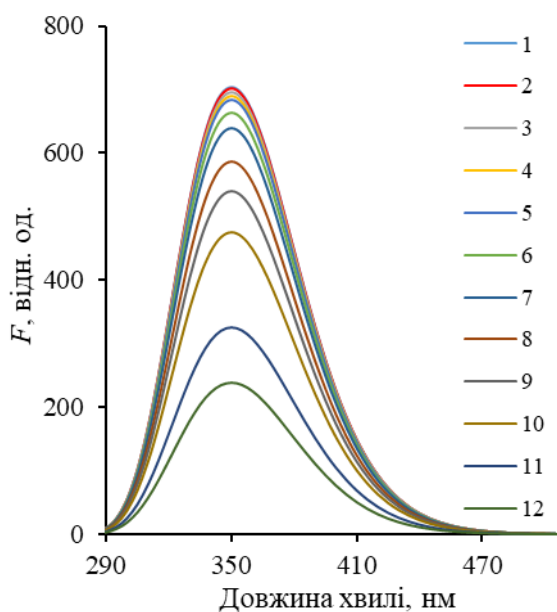


Рисунок 4.13 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей СОФ ($C_{\text{СОФ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 12): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, 300; рН 7,5, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К)

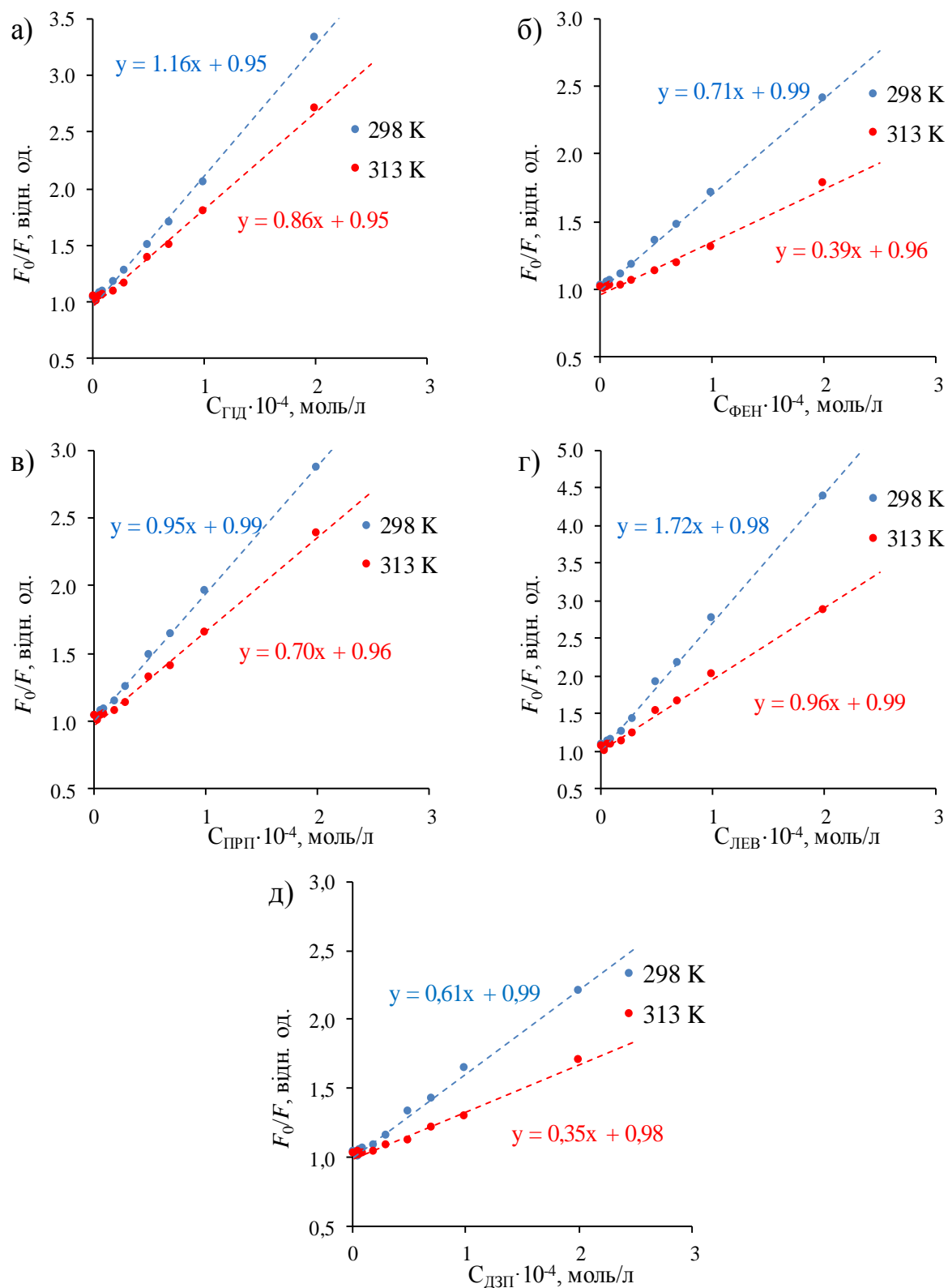


Рисунок 4.14 – Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрацій БД (ГІД (а), ФЕН (б), ПРП (в), ЛЕВ (г) і ДЗП (д)) за різних температур у координатах Штерна-Фольмера ($\text{pH } 7,5$, $\lambda_{\text{збуд}} = 280 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{еміс}} = 346 \text{ нм}$, $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$)

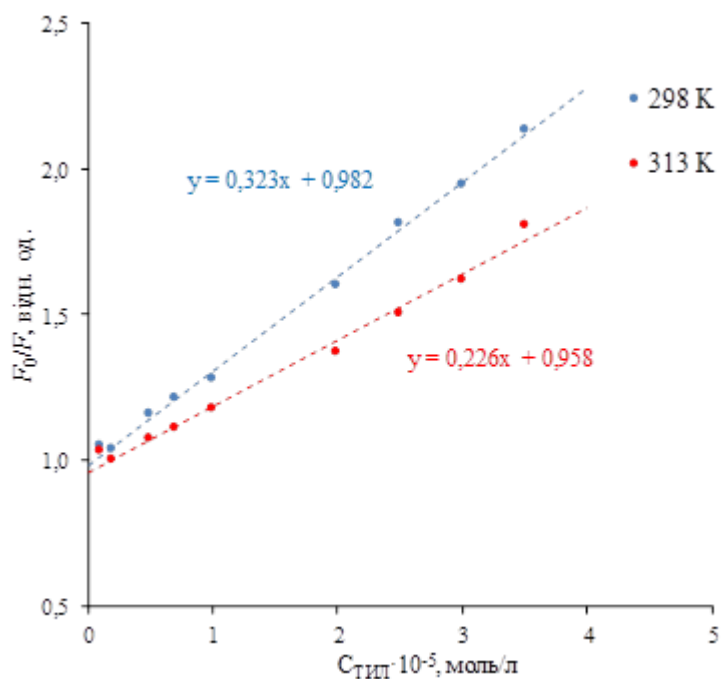


Рисунок 4.15 – Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрацій ТІЛ за різних температур у координатах Штерна-Фольмера (рН 7,4, $\lambda_{збуд} = 280$ нм, $\lambda_{еміс} = 346$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

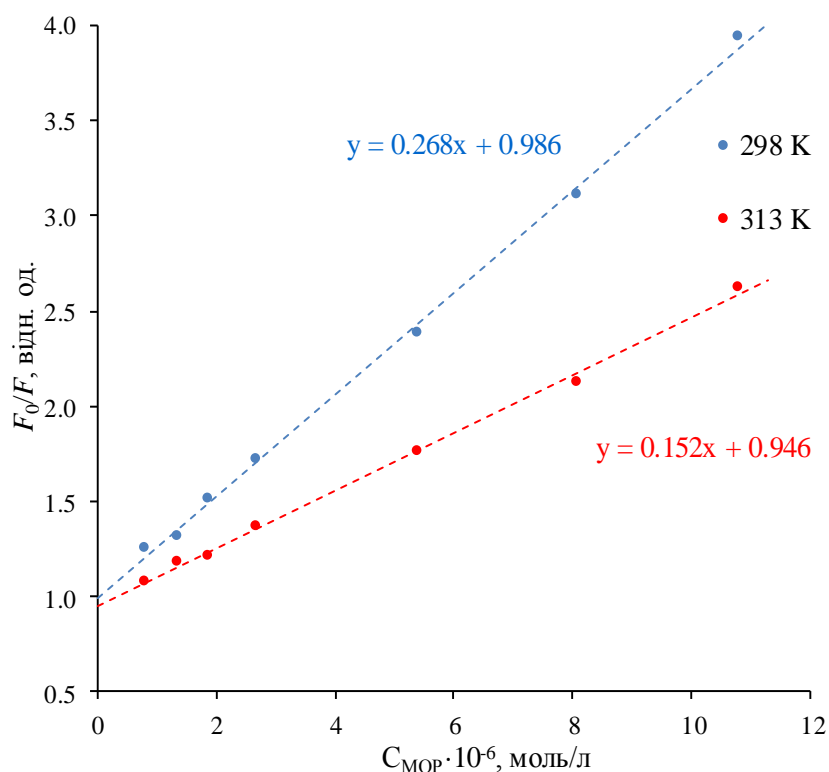


Рисунок 4.16 – Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрацій МОР за різних температур у координатах Штерна-Фольмера (рН 7,4, $\lambda_{збуд} = 260$ нм, $\lambda_{еміс} = 340$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

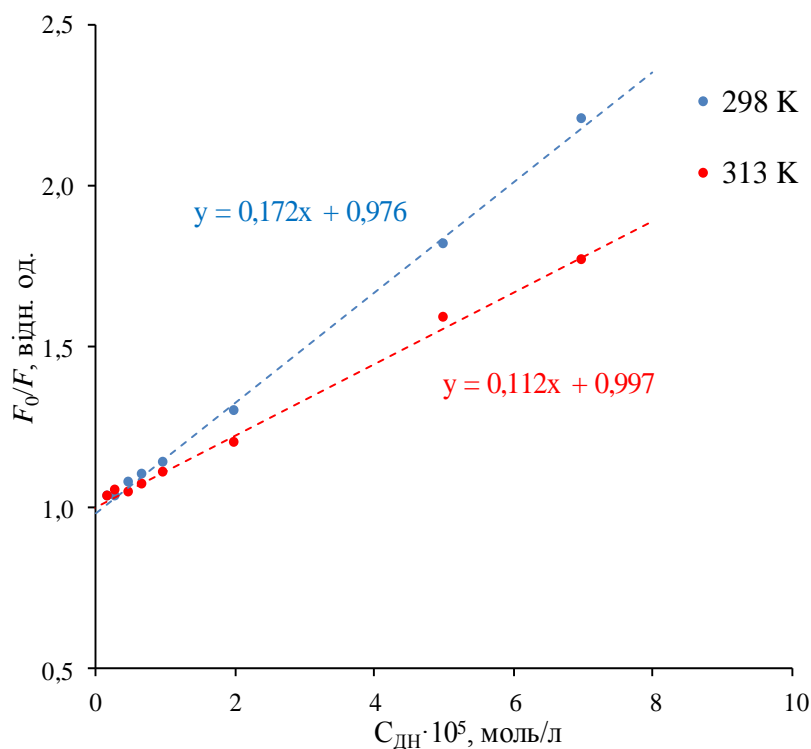


Рисунок 4.17 – Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрацій ДН за різних температур у координатах Штерна-Фольмера (рН 7,5, $\lambda_{збуд} = 280$ нм, $\lambda_{еміс} = 346$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л)

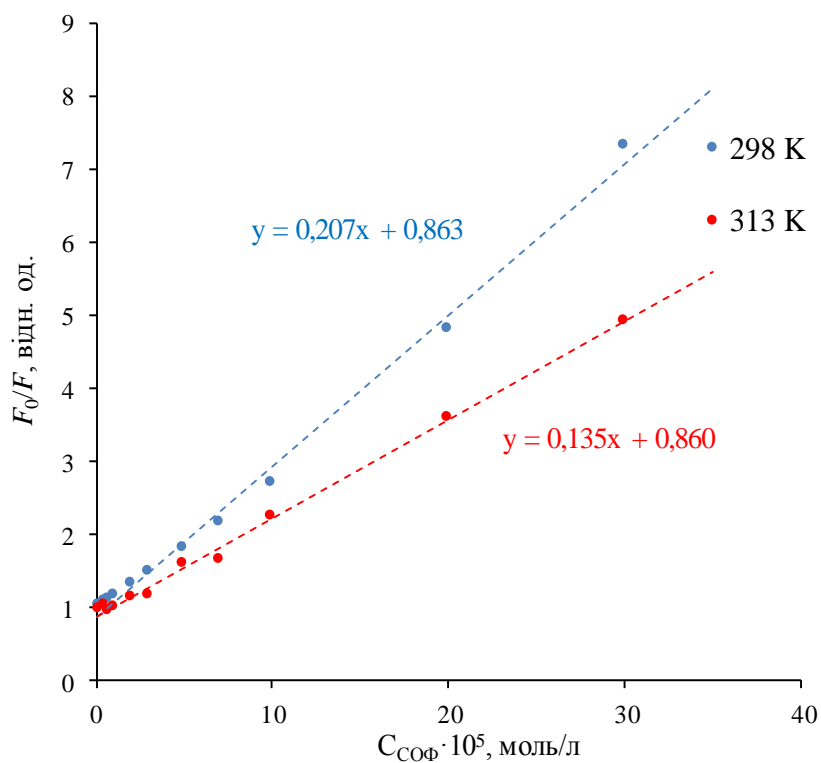


Рисунок 4.18 – Залежності гасіння флуоресценції САЛ від концентрацій СОФ за різних температур у координатах Штерна-Фольмера (рН 7,5, $\lambda_{збуд} = 260$ нм, $\lambda_{еміс} = 340$ нм, $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

Таблиця 4.1

Константи Штерна-Фольмера (K_{SV}), константи гасіння САЛ (k_q) при додаванні ЛР (298К) і 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
Даклатасвіру 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

4.3 Визначення констант зв'язування лікарських речовин з САЛ

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 низкою еквівалентних місць макромолекули:

$$K = \frac{[PL_n]}{[P] \cdot [L]^n}. \quad (4.3)$$

Загальні (аналітичні) концентрації реагентів ($[P]_t$ і $[L]_t$) пов'язані з їх рівноважними концентраціями за рівняннями матеріального балансу:

$$\begin{aligned} [P]_t &= [P] + [PL_n], \\ [L]_t &= [L] + n \cdot [PL_n]. \end{aligned} \quad (4.4)$$

Відносна зміна інтенсивності флуоресценції F буде пропорційною зміні концентрації флуорофора (протеїну):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[P]}{[P]_t}. \quad (4.5)$$

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

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \cdot \lg [L], \quad (4.6)$$

де:

F_0 – інтенсивність флуоресценції у відсутності гасника;

F – інтенсивність флуоресценції у присутності гасника.

З огляду на рівняння матеріального балансу (4.4), вираз для розрахунку константи зв'язування набуває такого вигляду:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \cdot \lg \left([L]_t - n \cdot [P]_t \cdot \frac{F_0 - F}{F_0} \right). \quad (4.7)$$

Отримане рівняння (4.7) є трансцендентним щодо коефіцієнта n . Для розрахунку цієї величини, спочатку у вираз, що стоїть під логарифмом, вноситься деяке фіксоване значення n' , потім регресійний аналізом оцінюється значення n як кутового коефіцієнта лінійної регресії. Після цього параметр n' підбирається ітераційним способом так, щоб виконувалася умова:

$$(n' - n)^2 \Rightarrow \min. \quad (4.8)$$

Значення зміни ентальпії (ΔH°) і зміни ентропії (ΔS°) отримано з рівняння Вант-Гоффа (4.9), вважаючи, що ΔH° не змінюється значно в експериментальному діапазоні температур:

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}. \quad (4.9)$$

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:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ. \quad (4.10)$$

Значення констант (K_A) і кількості місць зв'язування (n) для різних температур, а також значення ΔH° , ΔS° і ΔG° для адуктів САЛ-БД представлено в таблиці 4.2.

Як видно з наведених даних, з підвищенням температури значення K_A зменшуються. Очевидно, що більш висока температура призводить до зниження стійкості адуктів і міцності зв'язування.

Існує де кілька міжмолекулярних сил, що викликають зв'язування «малих» молекул ЛР з білками, таких, як ван-дер-ваальсові, водневі зв'язки, іонні, електростатичні, гідрофобні взаємодії та інші. Вид взаємодії визначають на підставі даних про зміну ентальпії (ΔH°) і ентропії (ΔS°). Якщо $\Delta H^\circ > 0$ і $\Delta S^\circ > 0$, то відбувається гідрофобна взаємодія, а якщо $\Delta H^\circ < 0$ і $\Delta S^\circ < 0$, то переважають водневі зв'язки та взаємодія Ван-дер-Ваальса, а якщо $\Delta H^\circ < 0$ і $\Delta S^\circ > 0$, то це обумовлено електростатикою [176].

Згідно з літературними даними негативні значення ΔH° і ΔS° можна віднести до Ван-дер-Ваальсових взаємодій в системах САЛ-БД і до утворення водневих зв'язків.

Таблиця 4.2

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

Назва препарату	T, K	$K_A \cdot 10^{-3}$ л·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.

4.4 Синхронна флуоресцентна спектроскопія

Спектр власної флуоресценції САЛ є чутливим до мікрооточення. Значення довжини хвилі випромінювання є важливим для оцінки гідрофобності оточення залишків триптофану. Зміна положення максимуму флуоресценції відповідає зміні полярності навколо молекули флуорофора. Синє зміщення (гіпсохромне) означає, що амінокислотні залишки розташовані у більш гідрофобному середовищі, тоді як червоне зміщення (батохромне) означає, що амінокислотні залишки знаходяться в полярному середовищі.

Інформацію про оточення молекули флуорофора можуть надавати синхронні спектри флуоресценції. Суть методу полягає в синхронному скануванні положення монохроматорів збудження і флуоресценції за фіксованої різниці довжин хвиль, а саме у вимірі спектру флуоресценції при одночасній зміні довжин хвиль збудженого і реєстрованого випромінювань. У процесі такого сканування підтримується постійна різниця між довжинами хвиль емісії і збудження ($\Delta\lambda = \lambda_{\text{ем}} - \lambda_{\text{збуд}}$).

Конформаційні зміни САЛ, викликані зв'язуванням з ЛР, оцінювали шляхом вимірювання синхронних спектрів флуоресценції САЛ до і після додавання різних кількостей ЛР (рисунки 4.19 – 4.27). Відповідно до літературних даних [177], спектри синхронної флуоресценції отримано за $\Delta\lambda = 15$ 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 залишка триптофану, а при $\Delta\lambda = 15$ нм показують практичну відсутність зміни максимуму довжини хвилі, що відображає незначну зміну оточення залишку тирозину.

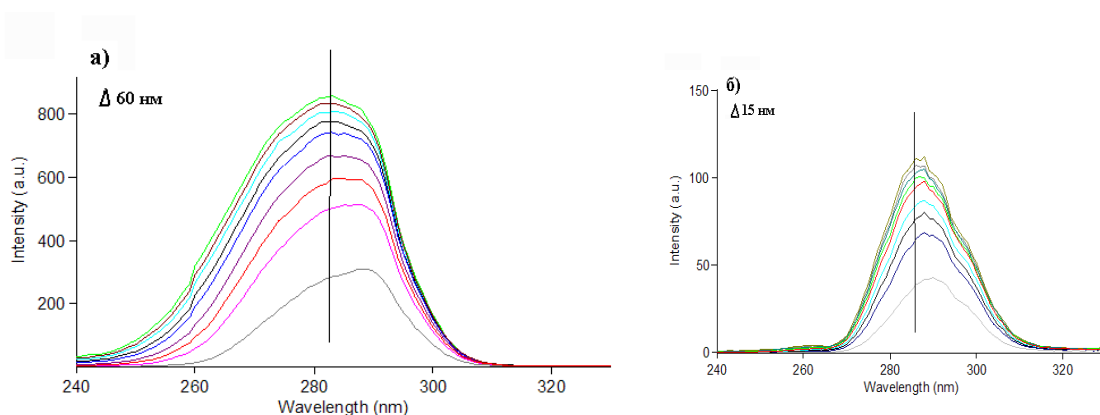


Рисунок 4.19 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ГІД ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{\text{ГІД}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

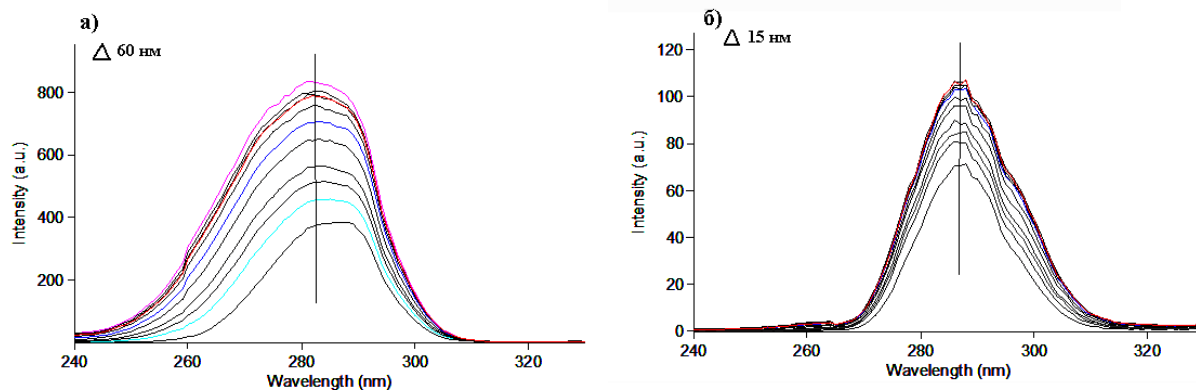


Рисунок 4.20 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ФЕН ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{ФЕН} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

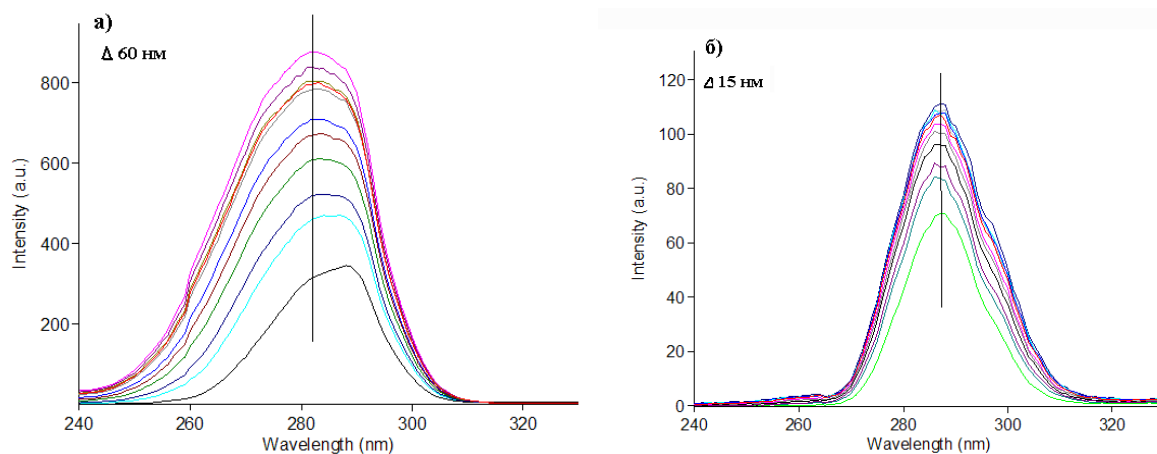


Рисунок 4.21 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ПРП ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{ПРП} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

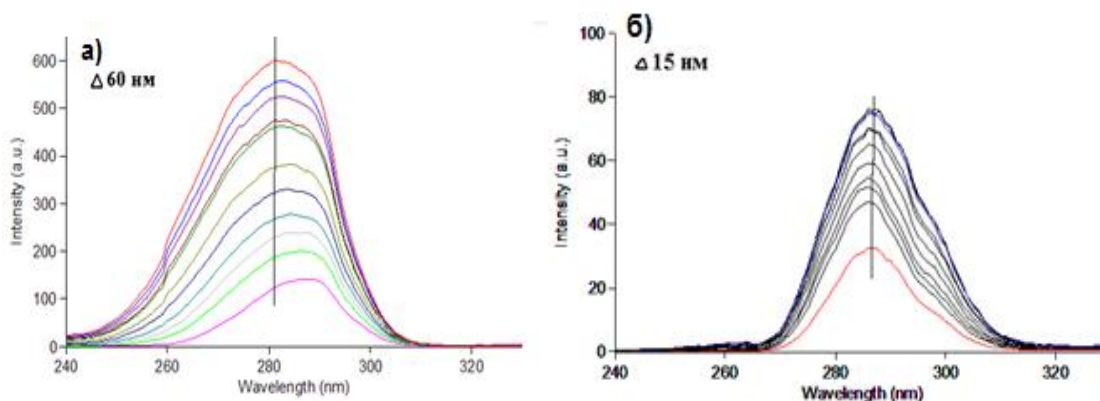


Рисунок 4.22 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ЛЕВ ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{САЛ} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{ЛЕВ} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

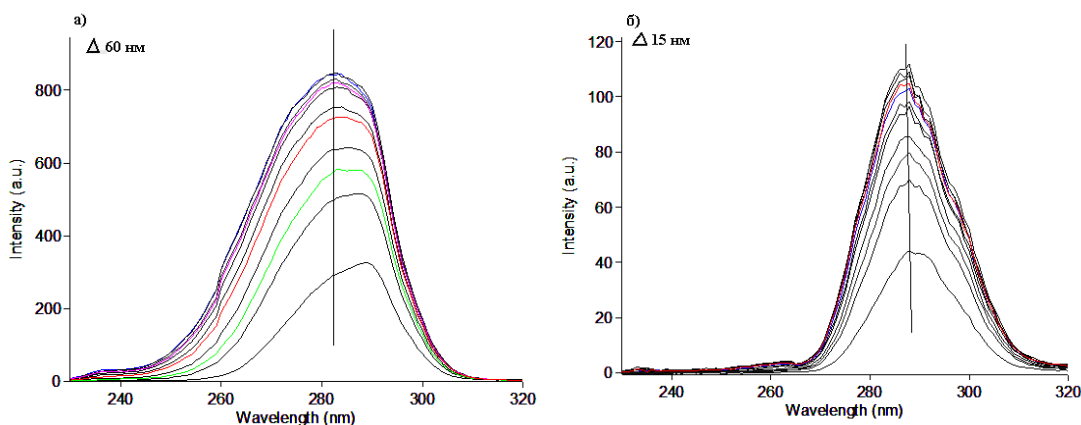


Рисунок 4.23 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ДЗП ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{\text{ДЗП}} \cdot 10^{-5}$ моль/л), криві (1 – 11): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, рН 7,5)

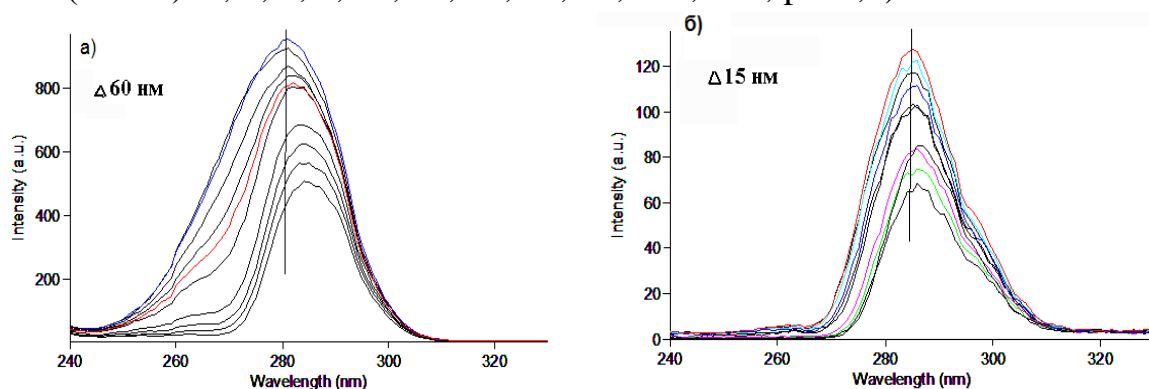


Рисунок 4.24 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ТИЛ ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; ($C_{\text{ТИЛ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 10): 0, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 25, 30, 35, рН 7,5)

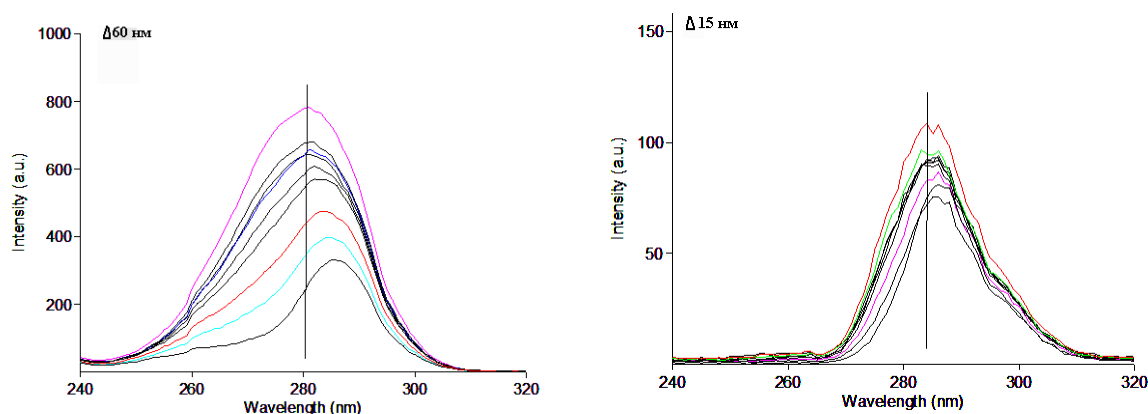


Рисунок 4.25 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей МОР ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; ($C_{\text{МОР}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 10): 0, 1, 2, 5, 7, 10, 20, 25, 30, 35, рН 7,5)

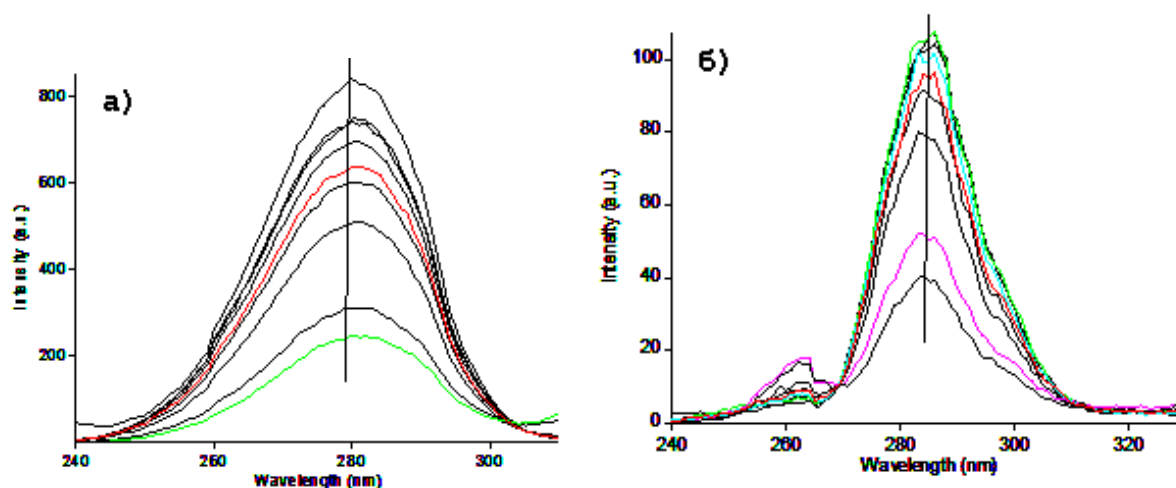


Рисунок 4.26 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей ДН ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л; ($C_{\text{ДН}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 9): 0, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50, 70, рН 7,5)

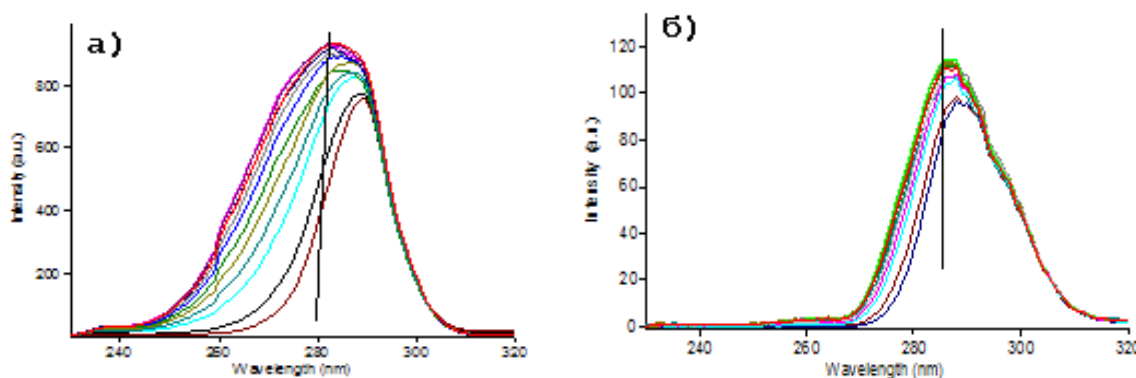


Рисунок 4.27 – Синхронні спектри САЛ при додаванні різних кількостей СОФ ($\lambda = 60$ нм (а) і $\lambda = 15$ нм (б)); $C_{\text{САЛ}} = 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л; ($C_{\text{СОФ}} \cdot 10^{-6}$ моль/л), криві (1 – 12): 0, 2, 5, 7, 10, 20, 30, 50, 70, 100, 200, 300 рН 7,5)

Синхронні спектри флуоресценції САЛ (рисунок 4.27) у присутності різних кількостей СОФ також показують батохромний зсув від 285 нм до 290 нм при $\Delta\lambda = 15$ нм, що свідчить про наявність змін конформації білка поблизу не тільки залишків триптофану, а й тирозину.

4.5 Резонансне перенесення енергії флуоресценції

Резонансне перенесення енергії флуоресценції (FRET) – це взаємодія, яка залежить від відстані між різними електронними збудженими станами молекул. У цій взаємодії енергія збудження переноситься від однієї молекули (донора) до іншої (акцептора) за допомогою прямої електродинамічної взаємодії без емісії фотона з вихідної молекулярної системи. Передача енергії може відбуватися за таких умов: коли донор має

власну флуоресценцію; коли існує перекривання спектру флуоресценції донора і спектру поглинання акцептора; і коли відстань між донором і акцептором є меншою ніж 8 нм. Ефективність передавання енергії між БД і залишком Трп214 САЛ може бути використаною для оцінки відстані між ними з використанням FRET. Перекривання спектру поглинання ЛР і спектру флуоресценції САЛ наведено на рисунках 4.28 – 4.30.

Відповідно до теорії безвипромінювального резонансного перенесення енергії Фьорстера, 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).

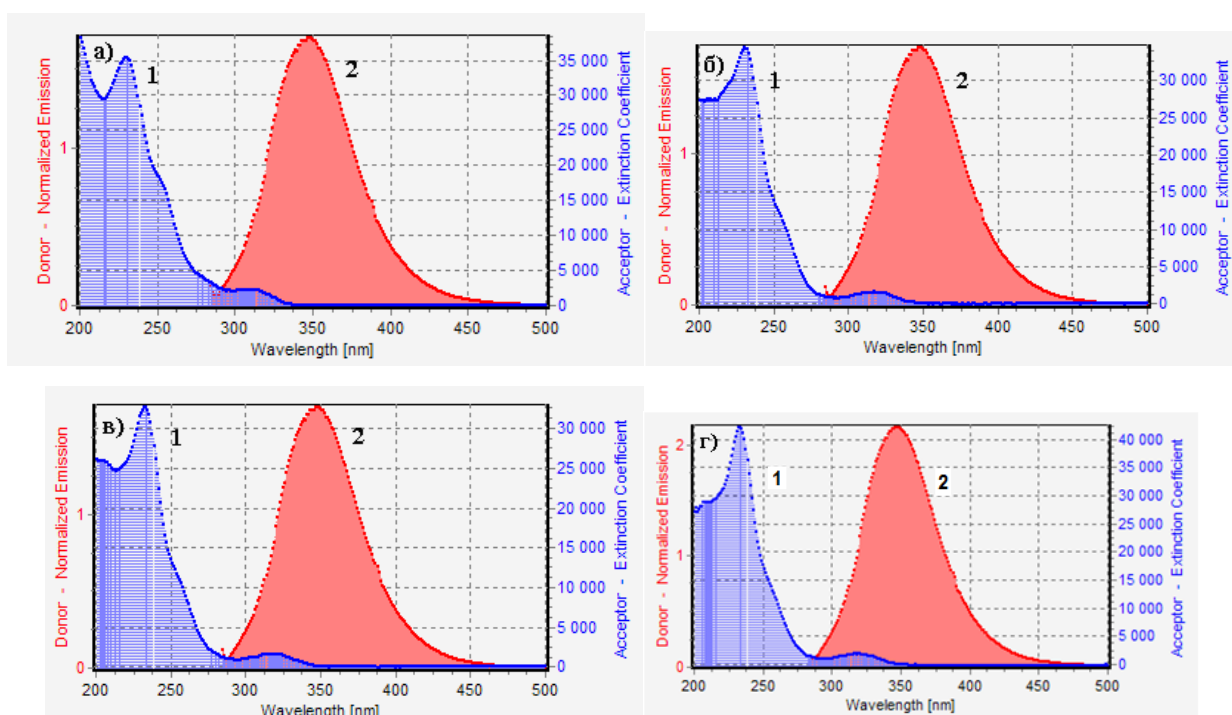


Рисунок 4.28 – Перекривання спектру поглинання (1) ГД (а), ФЕН (б), ПРП (в), ЛЕВ (г) і спектру флуоресценції САЛ (2) ($C_{САЛ}/C_{ЛР} = 1: 1,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{збуд} = 280$ нм)

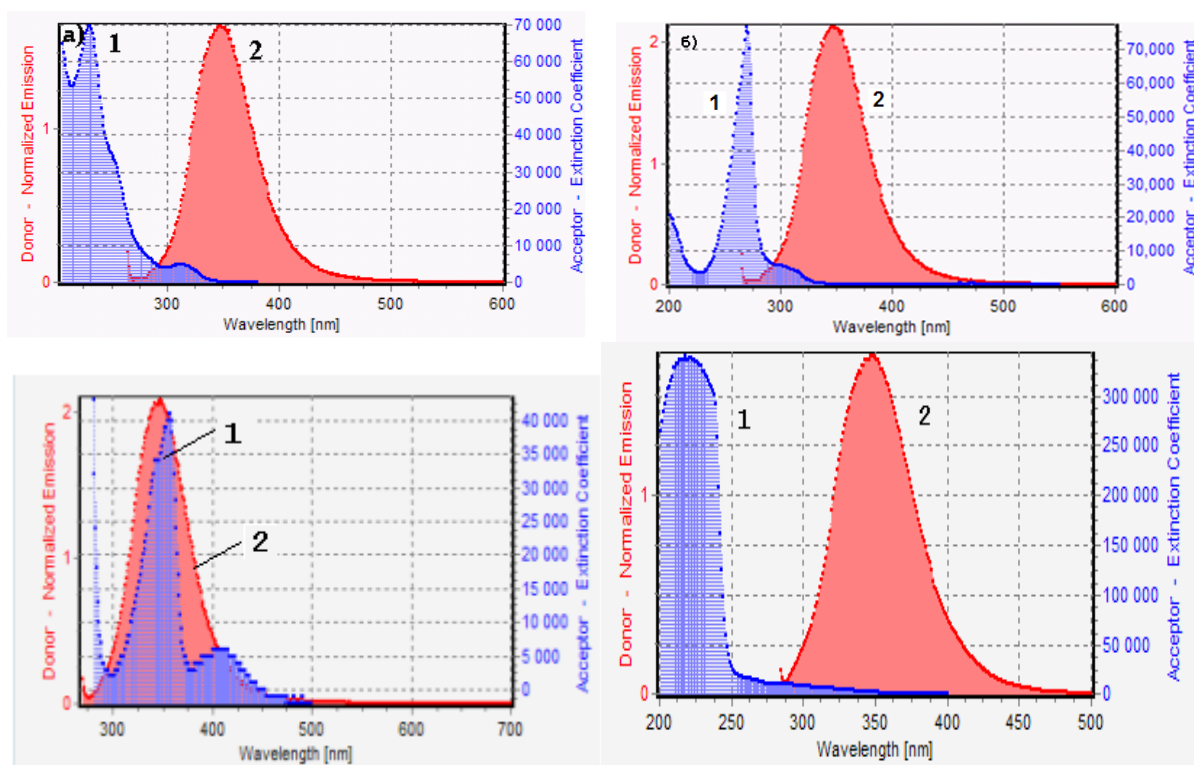


Рисунок 4.29 – Перекривання спектру поглинання (1) ДЗП (а), ТИЛ (б), МОР (в), ДН (г) і спектру флуоресценції САЛ (2) ($C_{САЛ}/C_{ТИЛ}$; ДН = 1:1; $C_{САЛ}/C_{ДЗП} = 1:2$; $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{САЛ}/C_{МОР} = 1:1$; $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{збуд} = 280$ нм).

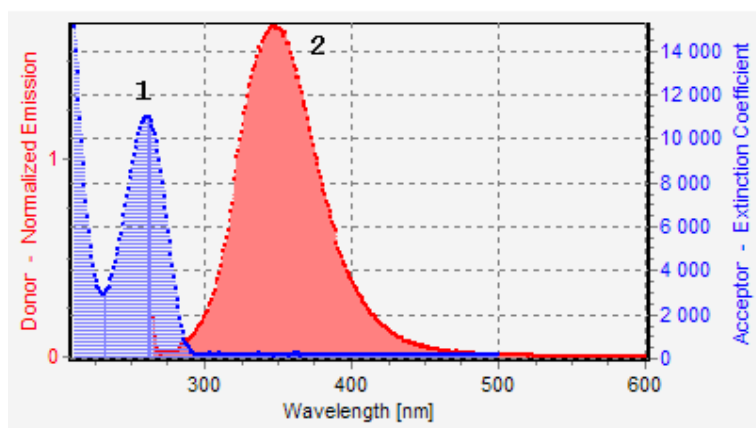


Рисунок 4.30 – Перекривання спектру поглинання СОФ (1) та спектру флуоресценції САЛ (2) ($C_{САЛ}/C_{СОФ} = 1:1$; 1×10^{-5} моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{збуд} = 280$ нм)

За теорією Фьорстера ефективність переносу енергії (E) може бути розрахованою за наступним рівнянням:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, \quad (4.11)$$

де:

r – відстань між акцептором (БД) і донором (САЛ);

R_0 – критична відстань при ефективності перенесення 50 %.

Величина R_0 розраховується за наступним рівнянням:

$$R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{-25} \cdot K^2 \cdot n^{-4} \cdot \varphi \cdot J, \quad (4.12)$$

де:

K^2 – фактор, що описує взаємну орієнтацію в просторі дипольних моментів переходів донора і акцептора (може варіюватися від 0 до 4; для випадково орієнтованих молекул донора і акцептора використовують $K^2 = 2/3$);

n – показник заломлення ($n = 1,336$);

φ – квантовий вихід флуоресценції донора ($\varphi = 0,118$);

J – інтеграл перекриття спектру випромінювання донора і спектру поглинання акцептора (рисунки 4.28 – 4.30), який визначається за формулою:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) \cdot d\lambda}, \quad (4.13)$$

де:

$F(\lambda)$ – нормована інтенсивність флуоресценції донора при довжині хвилі λ ;

$\varepsilon(\lambda)$ – молярний коефіцієнт поглинання акцептора при довжині хвилі λ .

Значення r , розраховані за рівнянням (4.11), для різних температур наведено у таблиці 4.3.

Відстань (r) між САЛ Trp214 і БД набагато менше 8 нм, що задовольняє співвідношенню $0,5R_0 < r < 1,5R_0$. Це означає, що з великою ймовірністю відбувається безвипромінювальна передача енергії від САЛ до БД, що відповідає механізму статичного гасіння.

Крім того, значення числа місць зв'язування n є близьким до одиниці, тому ми можемо зробити висновок, що існує тільки одне місце зв'язування в макромолекулі САЛ з ЛР (визначене за цим методом).

4.6 Розрахунок констант зв'язування за гасінням власної флуоресценції лікарської речовини

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

$$\frac{F}{F_0} = \frac{[L]}{[L]_t}, \quad (4.14)$$

Логарифмування рівняння (4.3) і спільне розв'язання рівнянь (4.4, 4.4 і 4.14), щодо рівноважних концентрацій, призводить до лінеаризації виразу залежності константи зв'язування K від загальних концентрацій $[P]_t$ і $[L]_t$, числа місць зв'язування n та інтенсивності флуоресценції:

$$\lg \frac{[L]_t \cdot (F_0 - F)}{n \cdot [P]_t \cdot F_0 - [L]_t \cdot (F_0 - F)} = \lg K + n \cdot \lg [L]_t \cdot \frac{F}{F_0}. \quad (4.15)$$

Рівняння (4.15), так саме як й рівняння (4.7), є трансцендентним щодо коефіцієнта n . Розрахунок цієї величини проводиться за процедурою, яку описано для першого випадку. Десятковий логарифм константи зв'язування, як в першому, так і в другому випадку, визначається оцінкою вільного члена лінійної регресії, тобто відрізком, який відтинає на осі ординат регресійна пряма в нульовій абсцисі.

Спектри гасіння флуоресценції індометацину (ІНД)

Взаємодію ІНД з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції білка при додаванні ІНД (рисунок 4.31 (а)). При збільшенні концентрації ІНД смуга флуоресценції САЛ перекривається спектром власної флуоресценції ІНД. Однак, в області поблизу 346 нм спостерігається невелика область спектру, де інтенсивність флуоресценції САЛ помітно зменшується.

У другому випадку (рисунок 4.31 (б)), спостерігалось монотонне падіння інтенсивності власної флуоресценції ІНД при додаванні САЛ практично на всій області спектру.

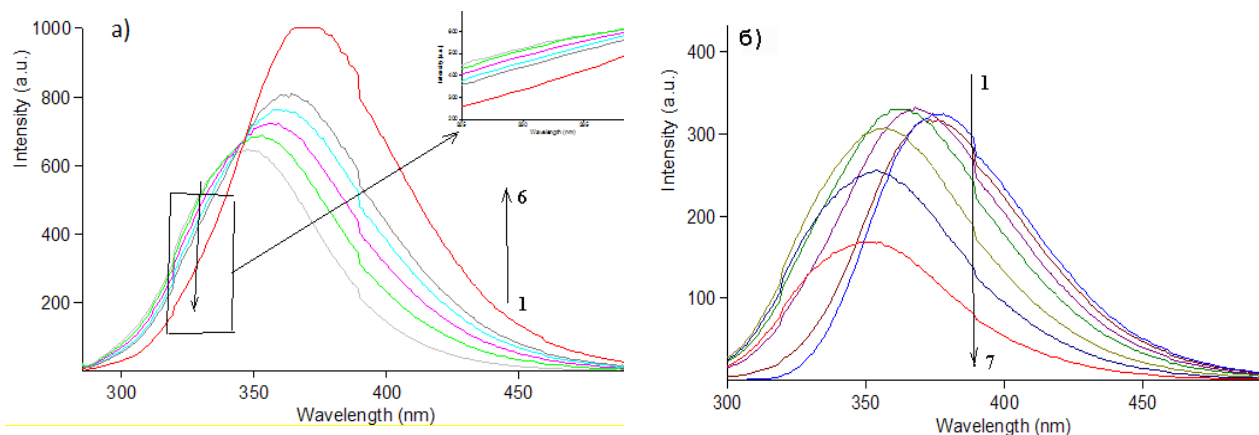


Рисунок 4.31 – Спектри флуоресценції САЛ в присутності різних кількостей ІНД (а) і спектри флуоресценції ІНД в присутності різних кількостей САЛ (б)

На рисунку 4.32 представлено графіки залежності $\lg Y$ від $\lg X$, де Y і X визначаються за рівняннями (4.7) і (4.15) в першому, і в другому випадках, відповідно. Вони демонструють задовільні лінійні кореляції, з яких розраховані $\lg K$ і кількості місць зв'язування (n) в системі САЛ-ІНД для різних способів гасіння (таблиця 4.4). Показано, що значення констант зв'язування, визначених за гасінням САЛ, за гасінням ІНД та літературні дані мають задовільну збіжність.

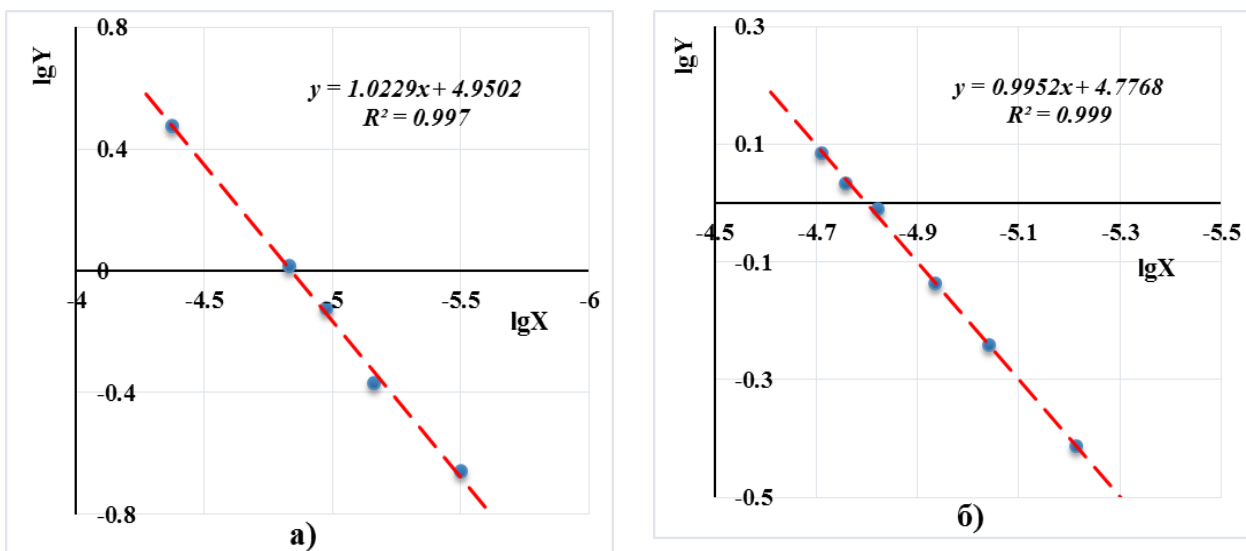


Рисунок 4.32 – Логарифмічна лінеаризація закону діючих мас для розрахунку $\lg K$ і числа місць зв'язування САЛ-ІНД, за гасінням флуоресценції САЛ (а) та за гасінням флуоресценції ІНД (б)

Таблиця 4.4

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 [178]	4,74	1,15

Спектри гасіння флуоресценції даклатасвіру дигідрохлориду (ДАК)

Результати експерименту показують, що власна флуоресценція ДАК проявляється в тій же самій області спектра, що й власна флуоресценція білка, і відбувається повне накладання його спектру емісії на власну флуоресценцію протеїну (рисунок 4.33, а)).

Взаємодію ДАК з САЛ оцінювали, фіксуючи зміни інтенсивності власної флуоресценції ДАК при додаванні САЛ (рисунок 4.33, б)). Емісія ДАК характеризується широкою смугою з максимумом при довжині хвилі 388 нм. При збільшенні концентрації САЛ інтенсивність флуоресценції ДАК помітно зменшується. Аналіз зміни емісії ДАК за різних концентрацій САЛ проводили за рівнянням (4.15). Отримані значення $\lg K$ і кількості місць зв'язування склали: $\lg K = 4,91$ и $n = 1,00$.

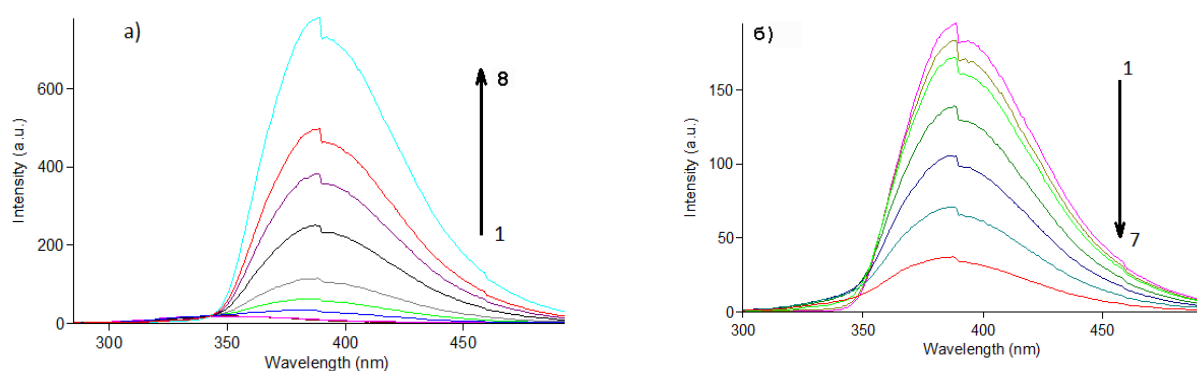


Рисунок 4.33 – Спектри флуоресценції САЛ у присутності різних кількостей ДАК (а) і спектри флуоресценції ДАК у присутності різних кількостей САЛ (б)

На рисунку 4.34 представлено графік в координатах рівняння (4.15), з якого розраховані $\lg K$ і кількості місць зв'язування (n) в системі САЛ-ДАК.

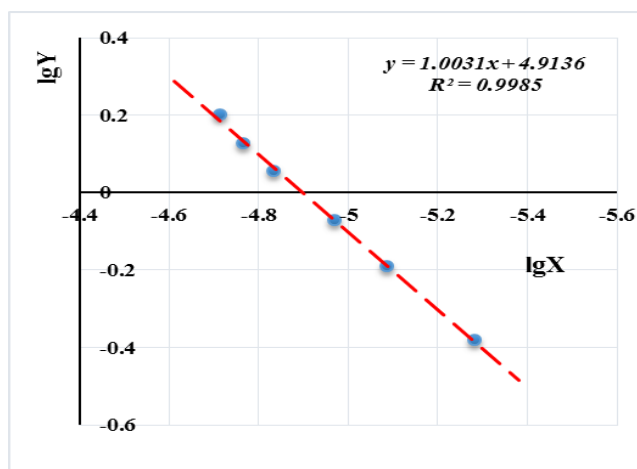


Рисунок 4.34 – Логарифмічна лінеаризація закону діючих мас для розрахунку $\lg K$ і числа місць зв'язування САЛ-ДАК за гасінням флуоресценції ДАК

Методики визначення

Перший випадок.

Зміна інтенсивності власної флуоресценції САЛ при додаванні ІНД:
 в мірні колби місткістю 10,0 мл вносять по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 мл робочого розчину ІНД ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). У кожену колбу додають по 1,0 мл трис-НСІ буферного розчину рН 7,5 і 1,0 мл розчину САЛ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Доводять водою до 10,0 мл і перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, що містить всі компоненти, крім ІНД. За 5 хв вимірюють інтенсивність люмінесценції за $\lambda_{\text{еміс}} = 330$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм) в кожній точці (F) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (F_0).

Зміна інтенсивності власної флуоресценції САЛ при додаванні ДАК:
 в мірні колби місткістю 10,0 мл вносять по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 мл робочого розчину ДАК ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). У кожену колбу додають по 1,0 мл трис-НСІ буферного розчину рН 7,5 і 1,0 мл розчину САЛ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Доводять водою до 10,0 мл і перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, що містить всі компоненти, крім ДАК. Через 5 хв вимірюють

інтенсивність люмінесценції за $\lambda_{\text{еміс}} = 330$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм) в кожній точці (F) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (F_0).

Другий випадок.

Зміни інтенсивності власної флуоресценції ІНД і ДАК при додаванні САЛ:

в мірні колби місткістю 10,0 мл вносять по 0,1; 0,5; 1, 2; 3, 5 мл робочого розчину САЛ ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). У кожну колбу додають 1,0 мл трис-НСІ буферного розчину рН 7,5 і 2,0 мл розчину ІНД (або ДАК) ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Доводять водою до 10,0 мл і перемішують. Паралельно готують розчин контрольної проби, що містить всі компоненти, крім САЛ. Через 5 хв вимірюють інтенсивність люмінесценції за $\lambda_{\text{еміс}} = 330$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм) в кожній точці (F) та інтенсивність люмінесценції контрольної проби (F_0).

Перенесення енергії

Ефективність передачі енергії між ІНД (ДАК) і САЛ може бути використаною для оцінки відстані між ними з використанням FRET. Перекривання спектру поглинання ІНД і спектру флуоресценції САЛ наведено на рисунку 4.35 (а), а перекривання спектру поглинання САЛ і спектру флуоресценції ІНД наведено на рисунку 4.35 (б). Перекривання спектру поглинання САЛ і спектру флуоресценції ДАК наведено на рисунку 4.36.

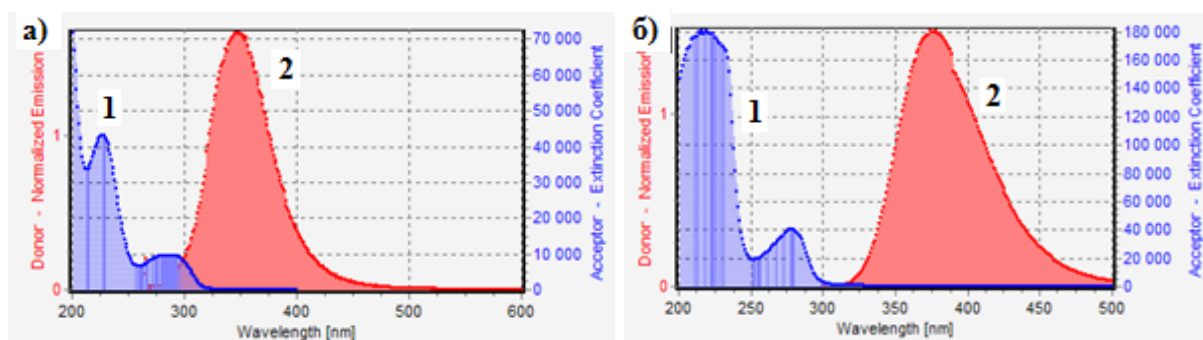


Рисунок 4.35 – Перекривання спектру поглинання ІНД (1) і спектру флуоресценції САЛ (2) (а) і перекривання спектру поглинання САЛ (1) і спектру флуоресценції ІНД (2) (б) ($C_{\text{САЛ}}/C_{\text{ІНД}} = 1:1$, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм)

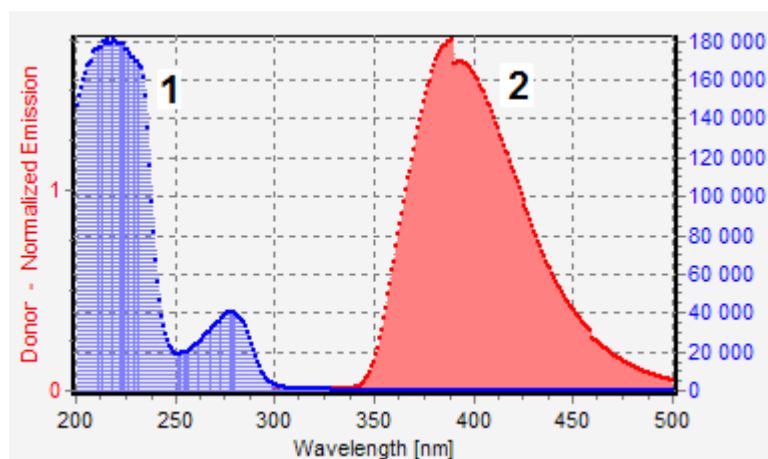


Рисунок 4.36 – Перекривання спектру поглинання САЛ (1) і спектру флуоресценції ДАК (2) ($C_{САЛ}/C_{ІНД} = 1:1$, 1×10^{-5} моль/л, $T = 298$ К, $\lambda_{возб} = 280$ нм)

Співставлення результатів флуоресцентного методу аналізу з рентгеноструктурними дослідженнями

Для комплексу САЛ-діазепам відомо дані щодо його будови, які були визначено рентгеноструктурним дослідженням. Згідно [179], діазепам (ДЗП) зв'язується з субдоменом ІІА САЛ. Середня відстань (r) між залишком Trp214 і ДЗП, визначена з використанням цього підходу, становить 1,91 нм (рисунок 4.37). Цей результат задовільно узгоджується з величиною відстані між донором і акцептором в системі САЛ-ДЗП, визначеною за FRET флуоресцентним методом аналізу – 1,76 нм (таблиця 4.1). Різниця в значеннях r , отриманих шляхом аналізу флуоресцентного гасіння і рентгенівської дифракції, становить 0,15 нм, що відповідає роздільній здатності рентгеноструктурного методу (0.295 нм).

Можливість флуоресцентного методу аналізу визначати 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 є набагато дорожчими, вимагають багато часу і мають обмеження з кристалізації білка.

З огляду на потребу фармацевтичної промисловості в стандартизованих процедурах вивчення зв'язування ЛР з білками, можна рекомендувати використання флуоресцентного методу аналізу для первинної оцінки потенційних взаємодій ксенобіотиків і САЛ.

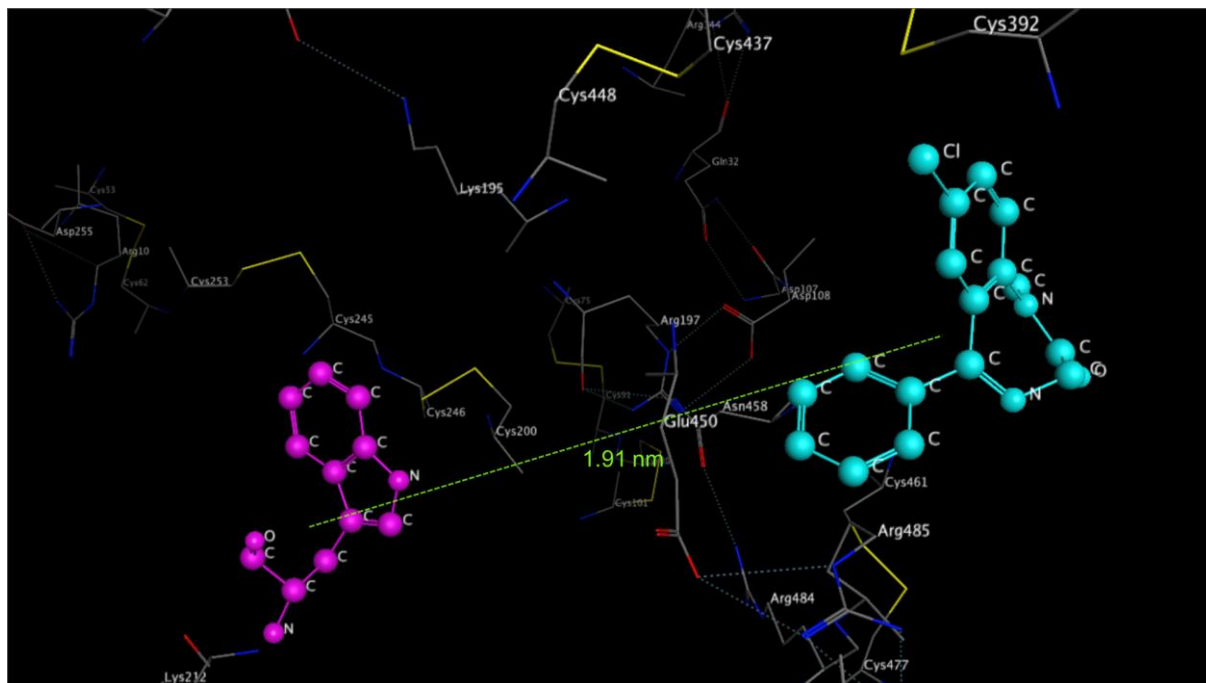


Рисунок 4.37 – Положення діазепаму (рожевий) в комплексі з САЛ щодо залишку триптофану Trp214 (блакитний), за результатами рентгеноструктурних досліджень

4.7 Визначення залишкових кількостей пропоксазепаму в змивах після очищення фармацевтичного обладнання

При фармацевтичній розробці нових препаратів найважливішою вимогою належної виробничої практики (GMP) є очищення обладнання, яка проводиться для запобігання його перехресної контамінації при переході від однієї лікарської речовини до іншої. З цією метою розроблено та валідовано люмінесцентну методику визначення залишкових кількостей іноваційної ЛР – пропоксазепаму на поверхнях фармацевтичного обладнання.

Методика базується на гасінні інтенсивності люмінесценції розчинів САЛ в залежності від концентрації пропоксазепаму (при необхідності розчин проби розводять до концентрації, що лежить в інтервалі лінійності калібрувального графіка).

Методика визначення

Розчин САЛ. Наважку 0,665 г САЛ (CAS 70024-90-7) поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл води при перемішуванні на магнітній мішалці і доводять до позначки водою.

Трис (гідроксиметил)амінометану-буферний розчин рН 7,5. Наважку 6,057 г трис(гідроксиметил)амінометану розчиняють у 800 мл води, доводять рН до 7,5 за допомогою хлористоводневої кислоти, доводять об'єм розчину до 1000,0 мл водою і перемішують.

Розчин для пробопідготовки. У мірну колбу місткістю 100,0 мл поміщають 10,0 мл розчину САЛ і 10,0 мл трис(гідроксиметил)амінометану-буферного розчину рН 7,5, доводять водою до позначки і перемішують.

Випробовуваний розчин. Сваб зі змивом забруднення обладнання (площа змиву – 100,0 см²) розміщують у лабораторну склянку місткістю 25 мл, додають 5,0 мл розчину для пробопідготовки і проводять десорбцію протягом 10 хв. При необхідності розчин розводять.

Обробка результатів

Вміст пропоксазепаму (X), в мікрограмах у змиві, розраховують за формулою:

$$X = 10 \cdot C \quad (4.16)$$

де: C – концентрація пропоксазепаму, отримана за градувальним графіком, у мікрограмах на мілілітр.

Вимірюють інтенсивності люмінесценції (F) випробуваного розчину і розчину для пробопідготовки (F_0) на спектрофлуориметрі в кюветі з товщиною поглинаючого шару 1,0 см при $\lambda_{\text{еміс}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм).

Концентрацію (мкг/мл) пропоксазепаму у випробовуваному розчині визначають за градувальним графіком.

Побудова градувального графіка

Вихідний розчин 1 РСЗ пропоксазепаму (408 мкг/мл). 0,0204 г РСЗ пропоксазепаму (точна наважка) поміщають в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють у 15 мл етанолу (96%), доводять до позначки тим же

розчинником і перемішують.

Вихідний розчин 2 РСЗ пропоксазепаму (40,8 мкг/мл). 5,0 мл вихідного розчину 1 РСЗ пропоксазепаму переносять в мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять до позначки етанолом (96%) і перемішують.

Градувальні розчини. В ряд мірних колб місткістю 10,0 мл вносять по 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 і 7,0 мл вихідного розчину 2 РСЗ пропоксазепаму і по 1,0 і 2,0 мл вихідного розчину 1 РСЗ пропоксазепаму. Додають 1,0 мл розчину САЛ та 1,0 мл трис (гідроксиметил) амінометана-буферного розчину рН 7,5, доводять водою до позначки і перемішують, отримуючи розчини з вмістом пропоксазепаму 0,82; 2,04; 2,86; 4,08; 8,16; 12,24; 20,4; 28,56; 40,80; 81,60 мкг/мл. За 5 хвилин вимірюють F при $\lambda_{\text{еміс}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм). Вимірюють інтенсивність F_0 розчину для пробопідготовки при $\lambda_{\text{еміс}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм).

За отриманими даними будують градувальний графік в координатах $\frac{F_0 - F}{F}$ від C , який є лінійним в інтервалі концентрацій 0,8 – 80 мкг/мл.

На рисунку 4.38 представлено лінійну залежність для визначення пропоксазепаму, яка описується рівнянням:

$$\frac{F_0 - F}{F} = 0,0433 + 0,0233 \cdot C \quad (4.17)$$

де: C – вміст пропоксазепаму в розчині, в мікрограмах на мілілітр.

Межа виявлення (МВ) становить – 0,5 мкг/мл.

Межа виявлення пропоксазепаму – 2,5 мкг/змив (тобто 2,5 мкг на сваб, яким зроблено змив з поверхні 100,0 см²).

Визначення ступеня вилучення пропоксазепаму

У модельних дослідах в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим етанолом (96%), з поверхні (100 см²), на яку штучно наносили 0,20 мг РСЗ пропоксазепаму. Далі вилучення пропоксазепаму проводили за методикою. В отриманому розчині люмінесцентним методом визначали вміст пропоксазепаму.

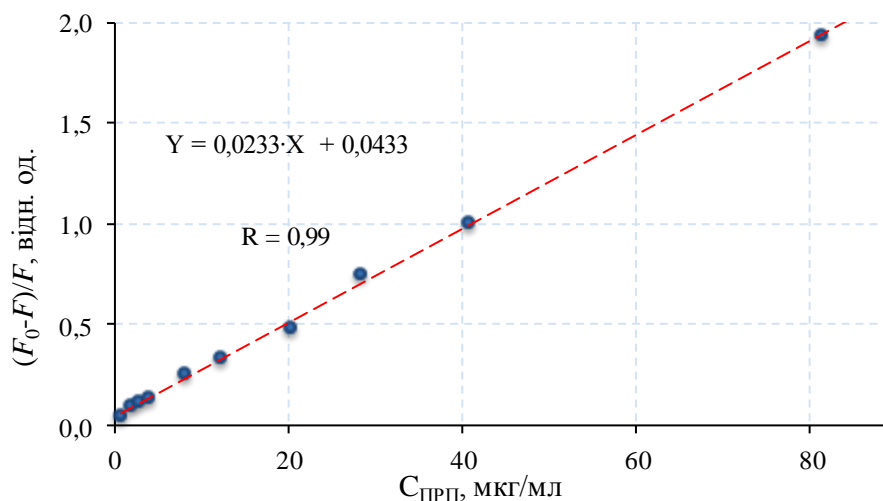


Рисунок 4.38 – Градувальний графік для визначення пропоксазепаму в інтервалі концентрацій 0,80 – 80 мкг/мл

Концентрацію (мкг/мл) пропоксазепаму в досліджуваному розчині визначали за градувальним графіком.

Результати кількісного вилучення пропоксазепаму (ступінь вилучення 85% – 88%) наведено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

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

4.8 Висновки до розділу 4

1. Проведено спектроскопічне вивчення взаємодії деяких ЛР з сироватковим альбуміном людини. Встановлено константи та число місць зв'язування, середні відстані між донорними і акцепторними молекулами для систем САЛ-ЛР. Показано, що ЛР гасять власну флуоресценцію білка в результаті статичної взаємодії в системі САЛ-ЛР.

2. Визначеної термодинамічні параметри зв'язування деяких ЛР з САЛ і встановлено, що важливу роль в 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.

3. 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. Для системи САЛ-софосбувір спостерігається наявність змін конформації білка поблизу не тільки залишків триптофану, а й тирозину.

4. Вперше показано можливість визначення констант зв'язування САЛ з молекулами лікарських речовин з гасіння їх власної флуоресценції. У разі ЛР, для яких відбувається накладення їх спектру емісії на власну флуоресценцію білка, 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 і акцепторними молекулами в системах САЛ-індометацин і САЛ-даклатасвіру дигідрохлорид.

5. На прикладі комплексної сполуки САЛ-діазепам проведено співставлення результатів флуоресцентного методу аналізу з рентгеноструктурними дослідженнями. Показано, що результати з визначення середньої відстані між активним центром зв'язування білка та

ЛР флуоресцентним методом задовільно узгоджуються з результатами рентгеноструктурного аналізу, що дозволяє запропонувати флуоресцентний метод у якості альтернативи більш дорогому і трудомісткого рентгенівського методу аналізу.

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

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 афінітету аміноалкоксифлуоренонів до ДНК.

3. Встановлено, що люмінесцентний зонд Tb(III)-L₂ можна рекомендувати для високочутливого визначення ДНК, а також для вивчення зв'язування протівірусних 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Watson J. D. Molecular structure of nucleic acids / J.D. Watson, F.H.C. Crick // *Nature*. – 1953. – Vol. 4356. – P. 737 – 738.
2. Lerman L. S. Structural consideration in the interaction of DNA and acridines / L.S. Lerman // *J. Mol. Biol.* – 1961. – Vol. 3. – P. 18 – 30.
3. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. / Д. Мецлер; [пер. с англ. – под ред. А. Е. Браунштейна.] – М.: Мир, 1980. – Т. 1: Химические реакции в живой клетке. – 407 с.
4. Intercalative binding to DNA of antitumour drugs derived from 3-nitro-1,8-naphthalic acid / M. J. Waring, A. Gonzalez, A. Jimenez., D. Vazquez // *Nucl. Acids Res.* – 1979. – Vol. 7, № 1. – P. 217 – 230.
5. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
6. Gamage S. A. Structure-activity relationships for substituted bis(acridine-4-carboxamides): a new class of anticancer agents / S.A. Gamage, J.A. Spicer, G.J. Atwell // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42, № 13. – P. 2383 – 2393.
7. Saucier J. M. The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs / J. M. Saucier, B. Festy, J. B. Le Pecq // *Biochimie*. – 1971. – Vol. 53, № 9. – P. 973 – 980.
8. Sturm J. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice. II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotides / J. Sturm, L. Schreiber, M. Daune // *Biopolymers*. – 1981. – Vol. 20, № 4. – P. 765 – 785.
9. Crothers D. M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers / D. M. Crothers // *Biopolymers*. – 1968. – Vol. 6, № 4. – P. 575 – 584.
10. Manning G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides / G.S. Manning // *Q. Rev. Biophys.* – 1978. – Vol. 2. – P. 179 – 246.
11. Moravek Z. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA / Z. Moravek, S. Neidle, B. Schneider // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30,

№ 5. – P. 1182 – 1191.

12. Demeunynck M. Small molecule DNA and RNA binders. From synthesis to Nucleic Acid Complexes./ M. Demeunynck, C. Bailly, W.D. Wilson // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2003. – 732 p.

13. Chen H. DNA bending and unwinding associated with actinomycin D antibiotics bound to partially overlapping sites on DNA / H. Chen, X. Liu, D.J. Patel // J. Mol. Biol. – 1996. – Vol. 258. – P. 457 – 479.

14. Jenkins T. C. Targeting multi-stranded DNA structures / T. C. Jenkins // Curr. Med. Chem. – 2000. – Vol. 7, № 1. – P. 99 – 115.

15. Denny W. A. DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design / W. A. Denny // Anticancer Drug Des. – 1989. – Vol. 4, № 4. – P. 241 – 263.

16. Wakelin L. P. G. Polyfunctional DNA intercalate agents / L. P. G. Wakelin // Med. Res. Rev. – 1986. – Vol. 6, № 3. – P. 275 – 340.

17. Baguley B. C. DNA intercalating anti-tumour agents / B. C. Baguley // Anticancer Drug Des. – 1991. – Vol. 6, № 1. – P. 1 – 35.

18. Krueger R. F. Tilorone Hydrochloride: An orally active antiviral agent / R. F. Krueger., G. D. Mayer // Science. – 1970. – Vol. 169, № 3951. – P. 1213 – 1214.

19. Mayer G. D. Tilorone Hydrochloride: Mode of action. / G. D. Mayer, R. F. Krueger. // Science. – 1970. – Vol. 169, № 3951. – P. 1214 – 1215.

20. Lyakhov S. A. Intercalative anti viral drugs: Mode of action / S. A. Lyakhov // Abstracts of 6th International Symposium on Molecular Aspects Of Chemotherapy, Gdansk, Poland – 8 – 11 September. – 1997. – P. 137

21. Lyakhov S. A. New approach to the anti viral drug design. / S.A. Lyakhov, S. A. Andronati, Y. I. Suveyzdis // Abstracts of XIVth international symposium on medicinal chemistry, Maastricht, the Netherlands – 8 – 12 September. – 1996 – P. 134.

22. Effect of acridine derivatives on the multiplication of herpes simplex

virus / I. Mucsi, J. Molnar, M. Tanaka, C. Santelli-Rouvier, A. M. Patelis, J. P. Galy, J. Barbe // *Anticancer Res.* – 1998. – Vol. 18, № 4. – P. 3011 – 3015.

23. Интерферониндуцирующие свойства моно- и бис-акридинов / С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова, Я. И. Сувейздис, С. А. Андронати, С. Л. Рыбалко, С. Т. Дядюн // *Хим.-фарм. журн.* – 2000. – Т. 34, № 9. – С. 20 – 21.

24. Синтез и противовирусная активность новых производных бис-акридинилгидразидов арилоксиуксусных кислот / С. А. Ляхов, Л. А. Литвинова, Я. И. Сувейздис, С. А. Андронати, С. Л. Рыбалко // *Хим.-фарм. журн.* – 2001. – Т. 35, № 12. – С. 10 – 13.

25. Crothers D. M. DNA structure and its distortion by drugs. In: *Stereodynamic of molecular systems* / D. M. Crothers, N. Dattagupta, M. Hogan Sarma R. H. (ed.). – New York: Pergamon Press. – 1979. – P. 383 – 395.

26. Wolfbeis O. S. The fluorescence of organic natural products, in: *Molecular luminescence spectroscopy: methods & applications.* / O. S. Wolfbeis. S. G. Schulman (ed.). – New York, 1985. – Vol. 1. – P. 167 – 369.

27. Long E. C. Commentary on demonstrating DNA intercalation. / C. E. Long., K. B. Jacqueline // *Acc. Chem. Res.* – 1990. – Vol. 23, № 9. – P. 271 – 273.

28. Fluorescence complex between ethidium bromide and nucleic acids / J. B. Lepesq, C. Paoletti, J. B. Lepesq, C. Paoletti // *J. Mol. Biol.* – 1967. – Vol. 27. – P. 87 – 106.

29. Tang H.W. Screening of anticancer drug by acridine orange – cellular DNA fluorescence inhibition / H. W. Tang, G. Q.Cheng, Y. E. Zeng // *Chem. J. Chinese University.* – 1997. – Vol. 18, №12. – P. 1960 – 1962.

30. Study on the dimer-monomer equilibrium of a fluorescent dye and its application in nucleic acids determination / H. M. Zhang, X. Q. Guo, Y. B. Zhao, D. Y. Wang, G. J. Xu // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – Vol. 361. – P. 9 – 17.

31. Improved fluorometric DNA determination based on the interaction of

the DNA / polycation complex with Hoechst 33258 / Y. Zhou, S. Mao, Y. Li, W. Chang // *Microchim. Acta.* – 2004. – Vol. 144. – P. 191 – 197.

32. Characterization of pico green reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation / V. L. Singer., L. J. Jones, S. T. Yue, R. P. Haugland // *Anal. Biochem.* – 1997. – Vol. 249. – P. 228 – 238.

33. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9 ed. Molecular Probes / R. P. Haugland (editor). – 2003. – 850 p.

34. High – sensitivity two – color detection of double - stranded DNA with a confocal fluorescence gel scanner using ethidium homodimer and thiazole orange / H. S. Rye , M. A. Quesada, M. Peck, R. A. Mathies, A. N. Glazer // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 19. – P. 327 – 333.

35. Kirschstein O. Quantitative and sequence specific analysis of DNA-ligand interaction by means of fluorescent intercalator probes / O. Kirschstein , M. Sip, L. Kittler // *J. Mol. Recognit.* – 2000. – Vol. 13. – P. 157 – 163.

36. Rye H. S. Fluorometric assay using dimeric dyes for double- and single – stranded DNA and RNA with picogram sensitivity / H. S. Rye , M. D. Jonathan , M. A. Quesada // *Anal. Biochem.* – 1993. – Vol. 208. – P. 144 – 150.

37. Duplex probes: a new approach for the detection of specific nucleic acids in homogenous assays / D. Kong , Y. Huang , X. Zhang , W. Yang, H. Shen, H. Mi // *Anal. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 491. – P. 135 – 143.

38. Brilliant cresyl blue as a new red region fluorescent probe for determination of nucleic acids / H. Zheng, X. L. Chen, C. Q. Zhu, D. H. Li, Q. Y. Chen, G. J. Xu // *Microchem.* – 2000. – Vol. 64. – P. 263 – 269.

39. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile blue, with DNA and its application to nucleic acids assay / Y. Chen, H. Li, Y. Zhao, H. Yang, Z. Zhu, G. Xu // *Analyst.* – 1999. – Vol. 124. – P. 901 – 906.

40. Determination of nucleic acids using phosphin 3R as a fluorescence probe / Z. Zhu, H. Yang, H. Li, G. Xu // *Anal. Chim. Acta.* – 1999. – Vol. 394. –

P. 177 – 184.

41. Interaction of norfloxacin with super-coiled DNA / Y. Hwangbo, Y. Lee, H. Park, R. Lee, M. Kim, S. Yi, K. Kim // Bull. Kor. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 24. – P. 579 – 582.

42. Molecular details of quinolone – DNA interactions: solution structure of an unusually stable DNA duplex with covalently linked nalidixic acid residues and non-covalent complexes derived from it / K. Siegmund, S. Maheshwary, S. Narayanan, W. Connors // Nucl. Acid. Res. – 2005. – Vol. 33, № 15. – P. 4838 – 4848.

43. Determination of DNA by use of the molecular «light switch» complex of Ru(bipy)(dppz)²⁺ / L. Ling, Z. He, G. Song, H. Han, H. Zhang, Y. Zeng // Microchim. Acta. – 2000. – Vol. 134. – P. 57 – 62.

44. Studies on the fluorescence reaction between nucleic acid and the complex of cobalt (II) with 5-(3-fluoro-4-chlorophenylazo)-8-sulfonamidoquinoline and its applications / Q. Cao, Y. Zhao, Y. Xu, C. Li, Z. Hu, Q. Xu // Anal. Biochem. – 2000. – Vol. 277. – P. 214 – 220.

45. Spectrofluorimetric determination of DNA with the ternary of quercetin-Zn(II) and DNA / Y. Zhang, Z. Zong, G. Gong, B. Sun, H. Duan, D. Mu, X. Xu // J. Lanzhou University (Natural Sciences). – 2000. – Vol. 36. – P. 100 – 104.

46. Huang C. Spectrofluorimetric determination of nucleic acids with aluminium(III)/8-hydroxyquinoline complex / C. Huang, Y. Li, S. Tong // Anal. Lett. – 1997. – Vol. 30, № 7. – P. 1305 – 1309.

47. Huang C. Fluorescence complexes of nucleic acids 8-hydroxyquinoline/lanthanum and the fluorometry of nucleic acids / C. Huang, K. Li, S. Tong // Anal. Lett. – 1996. – Vol. 29. – P. 1705 – 1717.

48. Study of the reaction between nucleic acid and Y-BPMPHD – CTMAB complex and its analytical application / X. Wu, S. Sun, J. Yang, Y. Wang, Y. Li, B. Su // J. Fluorescence. – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 113 – 118.

49. Fluorescence reaction between ribonucleic acid and terbium (III) and

determination of ribonucleic acid. / J. Yang, S. Tong, N. Jie, H. Gong, Z. Gao // Chinese Biochem. J. – 1996. – Vol. 12, № 2. – P. 143 – 146.

50. Ci Y. X. Selective Determination of DNA by its enhancement effect on the fluorescence of the Eu-tetracycline complex / Y. X. Ci, Z. L. Yuan, X. J. Liu // Anal. Chem. – 1995. – Vol. 67. – P. 1785 – 1788.

51. Liu R. Study of the interaction between nucleic acid and oxytetracycline-Eu³⁺ and its analytical application / R. Liu, J. Yang, X. Wu // J. Luminescence. – 2002. – Vol. 96. – P. 201 – 209.

52. The sensitive determination of nucleic acids using fluorescence enhancement of Eu³⁺-benzoylacetone-cetyltrimethylammonium bromide-nucleic acid system / X. Wu, C. Guo, J. Yang, M. Wang, Y. Chen, J. Liu // J. Fluorescence. – 2005. – Vol. 15, № 5. – P. 655 – 660.

53. Species-differentiable sensing of phosphate-containing anions in neutral aqueous solution based on coordinatively unsaturated lanthanide complex probes / S. Li, W. Yuan, C. Zhu, J. Xu // Anal. Biochem. – 2004. – Vol. 331. – P. 235 – 242.

54. Ci Y. Fluorescence reaction of terbium (III) with nucleic acids in the presence of phenanthroline / Y. Ci, Y. Li, W. Chang // Anal. Chim. Acta. – 1991. – Vol. 248. – P. 589 – 594.

55. Determination of DNA and RNA by their quenching effect on the fluorescence of the Tb³⁺ - Tiron complex . / Y. Zhao, D. Wang, X. Guo, J. Xu // Anal. Chim. Acta. – 1997. – Vol. 353. – P. 329 – 335.

56. Study of the reaction between nucleic acids and Tb-BPMPHD-CTMAB complex and its analytical application / X. Wu, J. Yang, F. Huang, M. Wang, L. Sun, G. Xu // Anal. Lett. – 1999. – Vol. 32, № 12. – P. 2417 – 2425.

57. Tong Ch. Sensitive determination of DNA based on the interaction between norfloxacin-Tb³⁺ complex and DNA / Ch. Tong, Zh. Hu, W. Liu // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53. – P. 6207 – 6212.

58. Sensitive luminescent determination of DNA using the terbium(III)–

difloxacin complex / A. V. Yegorova, Y. V. Scripinets, A. Duerkop, A. A. Karasyov, V. P. Antonovich, O. S. Wolfbeis // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 584. – P. 260 – 267.

59. Люминесцентное определение ДНК с использованием в качестве зондов новых комплексных соединений тербия / Ю. В. Скрипинец, Д. И. Александрова, А. В. Егорова, В. П. Антонович // *Журн. аналит. химии.* – 2006. – Т. 61, № 1. – С. 50 – 58.

60. New luminescent terbium complex for the determination of DNA / A. Yegorova, A. Karasyov, A. Duerkop, I. Ukrainets, V. Antonovich // *Spectrochim. Acta. Part A.* – 2005. – Vol. 61. – P. 109 – 116.

61. Tong Ch. Enoxacin–Tb³⁺ complex as an environmentally friendly fluorescence probe for DNA and its application / Ch. Tong, Zh. Hu, W. Liu // *Talanta.* – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 816 – 821.

62. Development and Validation of A Spectrofluorimetric Determination of Calf Thymus DNA Using a Terbium-Danofloxacin Probe / N.Soltani, J. L. Manzoori, M. Amjadi, F. Lotfipour, A. Jouyban // *Pharm. Sci.*– 2016. – Vol. 22. – P. 2 – 8.

63. Detection of streptococcus pneumoniae DNA by using polymerase chain reaction and microwell hybridization with europium-labelled probes / S. Rintamaki, A. Saukkoriipi, P. Salo, A. Takala, M. Leinonen // *J. Microbiol. Methods.* – 2002. – Vol. 50. – P. 313 – 318.

64. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (trupoint) for nucleic acid detection / A. Ylikoski, A. Eloma, P. Ollikka, H. Hakala, V. M. Mikkala, J. Hovinen, I. Hemmilä // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50. – P. 1943 – 1947.

65. Homogeneous time – resolved fluorescence DNA hybridization assay by DNA-mediated formation of an EDTA-Eu(III)- β -diketonate ternary complex / G. L. Wang, J. L. Yuan, K. Matsumoto, Z. D. Hu // *Anal. Biochem.* – 2001. – Vol. 299. – P. 169 – 172.

66. Сорокина Д. А. Структурно-функциональные свойства белков / Д.А. Сорокина, И. Н. Залевская. – К.: Вища школа, 1990. – 216 с.
67. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. –Кн.2. – М.: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.
68. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров / Н. Л. Векшин. – Пущино, Фотон-век, 2006. – 100 с.
69. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные методы исследования и клинической диагностики: Сб. науч. тр. /Под ред. Г. Е. Добрецова. – Рига, 1991.
70. Кантор Ч.Р. Биофизическая химия: в 3-х т. / Ч. Р. Кантор, П. Р. Шиммел. – М.: Мир, 1985.
71. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск: Наука и техника, 1972. – 278 с.
72. Грызунов Ю. А. Свойства связывающих центров альбумина: метод исследования в биологических жидкостях и опыт его применения для оценки состояния организма: Дис. ... д-ра биол. наук.: 03.00.02 / Грызунов Ю. А. – М., 2003. – 180 с.
73. Владимиров Ю. А. Спектры люминесценции ароматических аминокислот и белков / Ю. А. Владимиров, Э.А. Бурштейн // Биофизика. – 1960.– Т. 5, № 4. – С. 385 – 392.
74. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков / А. П. Демченко. – К.: Наук. думка, 1988. – 280 с.
75. Иванова С. В. Использование флуоресцентных методов в медицине / С. В. Иванова, Л. Н. Кирпичёнок // Медицинские новости. – 2008. – №12. – С. 25 – 31.
76. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г.Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
77. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz.

2nd Edition, 1999. – 698 p.

78. Selvin P. R. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer / P. R. Selvin, J. E. Hearst // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 10024 – 10028.

79. Агранович В. М. Перенос электронного возбуждения в конденсированных средах / В.М. Агранович, М.Д. Галанин – М.: Наука, 1978. – 383 с.

80. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В.Л. Ермолаев, Е. Н. Бодунов, Е. В. Свешникова, Т. А. Шахвердов – Л.: Наука, 1977. – 311 с.

81. Förster T. Intermolecular Energy Migration and Fluorescence / T. Förster // Ann. Phys. – 1948. – Vol. 437, № 1 – 2. – P. 55 – 75.

82. Dexter D. L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids / D. L. Dexter // J. Chem. Phys. – 1953. – Vol.21, № 5. – P. 836 – 850.

83. Теренин А.Н. Перенос и миграция энергии в биохимических процессах. / А. Н. Теренин // Успехи физических наук. – 1951. – Т. XLIII, вып. 3. – С. 347 – 379.

84. Ghisaidoobe A. B. T. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques / A. B. T. Ghisaidoobe, S. J. Chung // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15. – P. 22518 – 22538.

85. Parkhurst K. M. Kinetic studies by fluorescence resonance energy transfer employing a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the oligonucleotide complement and to single-stranded DNA / K. M. Parkhurst, L. J. Parkhurst // Biochem. – 1995. – Vol. 34. – P. 285 – 292.

86. Nichols J. W. Resonance energy transfer assay of protein-mediated lipid transfer between vesicles / J.W. Nichols, R.E. Pagano // J. Biol. Chem. – 1983. – Vol. 258. – P. 5368 – 5371.

87. Khanna P. L. 4',5'-Dimethoxy-6-carboxyfluorescein: a novel dipole-

dipole coupled fluorescence energy transfer acceptor useful for fluorescence immunoassays / P. L. Khanna, E. F. Ullman // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 108. – P. 156 – 161.

88. Koch W. J. Drug therapy: Binding of drugs to serum albumin. / W. J. Koch, E. M. Sellers // *J Med.* – 1976. – Vol. 294. – P. 526 – 531.

89. Eftink M. R. Fluorescence quenching studies with proteins / M. R. Eftink, C. A. Ghiron // *Anal. Biochem.* – 1981. – Vol. 114, № 2. – P. 199 – 227.

90. Бендер К. И. Роль конформационных изменений сывороточного альбумина и взаимодействие с ним лекарственных веществ / К. И. Бендер, А. Н. Луцевич, В. В. Купчиков // *Фармакол. токсикол.* – 1989. – Т. 52, № 5. – С. 85 – 95.

91. Пшенкина Н. Н. Сывороточный альбумин: структура и транспортная функция / Н. Н. Пшенкина // *Фармакология.* – 2011. – Т. 12. – С. 1067 – 1091.

92. Probing the binding of scutellarin to human serum albumin by circular dichroism, fluorescence spectroscopy, FTIR and molecular modeling method / J. N. Tian, J. Q. Liu, W. He, Z. O. Hu, X. J. Yao, X. G. Chen // *Biomacromolecules.* – 2004. – Vol. 5. – P. 1956 – 1961. (doi.org/10.1021/bm049668m)

93. Carter D. C. Structure of human serum albumin / D. C. Carter, X. M. He // *Science.* – 1990. – Vol. 249. – P. 302 – 303.

94. Sugio S. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution / S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki // *Protein Eng.* – 1999. – Vol. 12, № 6. – P. 439 – 446.

95. Sudlow G. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol / G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1975. – Vol. 2, № 2. – P. 129 – 140.

96. Ghuman J. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin / J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas // *J. Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 353, № 1. – P. 38 – 52.

97. Albumin– drug interaction and its clinical implication / K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – P. 5435 – 5443. (doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005).
98. Peters T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. / Peters T. – San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996. 432 p.
99. Kwon S. Fluorescence quenching and dequenching analysis of RNA interactions *in vitro* and *in vivo*. / S. Kwon, J. H. Carson // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol. 264. – P. 133 – 140 (doi.org/10.1006/abio.1998.2846)
100. Roy S. Review on interaction of serum albumin with drug molecules research and reviews / S. Roy // *J. Pharmacol. Toxicol. Stud.* – 2016. – Vol. 4, № 2. – P. 7 – 16.
101. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach. / P. B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S. M. T. Shaikh, Y. Jadegoud, O. B. Ijare // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – Vol. 41, № 2. – P. 393 – 399.
102. Study of the interaction of carbamazepine with bovine serum albumin by fluorescence quenching method. / C. Wang, Q. H. Wu, Z. Wang, J. Zhao // *Anal. Sci.* – 2006.– Vol. 22, № 3. – P. 435 – 438.
103. Ni Y. Spectrofluorimetric studies on the binding of salicylic acid to bovine serum albumin using warfarin and ibuprofen as site markers with the aid of parallel factor analysis. / Y. Ni, S. Su, S. Kokot // *Anal.Chim.Acta.* – 2006. – Vol. 580, № 2. – P. 206 – 215.
104. Cao X. M. Spectroscopic study on binding of indomethacin to bovine serum albumin. / X. M. Cao, L. M. Du // *Spectr. Spectral Anal.* – 2007. – Vol. 27, № 5. – P. 973 – 977.
105. Binding interaction of indomethacin with human serum albumin / M. Bogdan, A. Pirnau, C. Floare, C. Bugeac // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 47. – P. 981 – 984.
106. Interaction of mitoxantrone with human serum albumin: Spectroscopic

and molecular modeling studies / S. N. Khan, B. Islam, R. Yennamalli, A. Sultan, N. Subbarao, A. U. Khan // *Europ. J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 35. P. 371 – 382.

107. Studies on the interaction between imidacloprid and human serum albumin: Spectroscopic approach / Y. Wang, B. Tang, H. Zhang, Q. Zhou, G. Zhang // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* – 2009. – Vol. 94. – P. 183 –190.

108. Analysis of binding interaction between captopril and human serum albumin / X. Gao, Y. Tang, W. Rong, X. Zhang, W. Zhao, Y. Zi // *Amer. J. Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 2. – P. 250 – 257.

109. Shahper N. K. Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effect on structural state of protein / N. K. Shahper, B. Islam, A. U. Khan. // *Int. J Integr. Biol.* – 2007. – Vol. 1, № 2. – P. 102 – 112.

110. Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods / H. Xu, N. Yao, H. Xu, T. Wang, G. Li, Z. Li // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 14185 – 203.

111. Sarkar A. Selective fluorescence resonance energy transfer from serum albumins to a bio-active 3-pyrazolyl-2-pyrazoline derivative. A spectroscopic analysis / A. Sarkar, S. C. Bhattacharya // *J. Luminescence.* – 2012. – Vol. 132. – P. 2612 – 2618.

112. Luminescent study on the binding interaction of bioactive imidazole with bovine serum albumin-A static quenching mechanism / J. Jayabharathi, V. Thanikachalam, N. Srinivasan, M. V. Perumal // *Spectrochim. Acta. A.* – 2011. – Vol. 84. – P. 233 – 237.

113. Spectroscopic studies on the interaction between erlotinib hydrochloride and bovine serum albumin / F. Rasoulzadeh, D. Asgari, A. Naseri, M. R. Rashidi // *DARU.* – 2010. – Vol. 18. – P. 179 – 184.

114. Hossain M. Interaction of the anticancer plant alkaloid sanguinarine with bovine serum albumin / M. Hossain, A. Y. Khan, G. S. Kumar // *PLOS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. 18333 (www.plosone.org)

115. A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin / A. S. Roy, D. R. Tripathy, A. Chatterjee, S. Dasgupta // *J. Biophys. Chem.* – 2010. – Vol. 1. – P.141 – 52 (doi:10.4236/jbpc.2010.13017)

116. Varlan A. Bovine and human serum albumin interactions with 3-carboxyphenoxathiin studied by fluorescence and circular dichroism spectroscopy / A. Varlan, M. Hillebrand // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15. – P. 3905 – 3919 (doi:10.3390/molecules15063905)

117. The interaction of plant-growth regulators with serum albumin: Molecular modeling and spectroscopic methods / S. Dong, Z. Li, L. Shi, G. Huang, S. Chen, T. Huang // *Food Chem. Toxicol.* – 2014. – Vol.67. – P.123 – 130.

118. Jin J. Spectrophotometric studies on the interaction between pazufloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme / J. Jin, X. Zhang // *J. Lumin.* – 2008. – Vol.128. – P.81 – 86.

119. Zhang H. M. Fluorimetric study of interaction of benzidine with trypsin / H. M. Zhang, Y. Q. Wang, Q. H. Zhou // *J. Lumin.* – 2010. – Vol.130. – P.781 – 786.

120. Li D. Spectrophotometric studies on the interaction between nevadensin and lysozyme / D. Li, J. Zhu, J. Jin // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* – 2007. – Vol. 189. – P. 114 – 120.

121. Multi-spectroscopic investigation of the binding interaction of fosfomycin with bovine serum albumin / M. D. Meti, Sh. T. Nandibewoor, S. D. Joshi, U. A. More, Sh. A. Chimatadar // *J Pharm. Anal.* – 2015. – Vol. 5. – P. 249 – 255.

122. Naik P.N. Non-covalent binding analysis of sulfamethoxazole to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, UV-vis, FT-IR, voltammetric and molecular modeling / P. N. Naik, Sh. T. Nandibewoor, Sh. A. Chimatadar // *J. Pharm. Anal.* – 2015. – Vol. 5. – P. 143 – 152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.003>.

123. Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin / H. Lin, J. Lan, M. Guan, F. Sheng, H. Zhang // *Spectrochim Acta A Mol Biomol. Spactrosc.* – 2009. – Vol. 73, № 5. – P. 936 – 941 (<http://www.paper.edu.cn>)

124. Characterization of the interaction between cationic thulium (III)–porphyrin complex with bovine serum albumin / X. L. Lu, H. C. Yang, H. Wu, A. X. Hou // *J. Mol. Biomark. Diagn.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1000126 (<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9929.1000126>)

125. Molecular self-assembling and the fluorescence enhancement in morin–Al³⁺–cetyltrimethylammonium bromide–protein system / F. Wang, J. Yang, X. Wu, X. Wang, C. Sun, S. Liu, C. Guo // *Biochimie.* – 2006 . – Vol. 88. – P. 121 – 129.

126. Binding analysis of farrerol to lysozyme by spectroscopic methods / J. Zhu, D. Li, J. Jin, L. Wu // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2007. – Vol. 68. – P. 354 – 359.

127. Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins / Z. Hongwei, G. Min, Z. Zhaoxia, W. Wenfeng, W. Guozhong // *Spectrochim. Acta Par. A.* – 2006. – Vol. 65. – P. 811 – 817.

128. Studies of the interaction of bovine serum albumin with pyrimidine-annulated spirodihydrofuran and its biological activities. / S. Roy, S. Ganai, R. K. Nandi, K. C. Majundar, T. K. Das. // *Adv. Mater. Lett.* – 2015. – Vol. 6, № 11. – P. 1018 – 1024.

129. Yasseen Z. J. Studies on binding of widely used drugs with human serum albumin at different temperatures and pHs / Z. J. Yasseen, M. E. Ghossain // *J. Biomedical Sci.* – 2016. – Vol. 5, № 3. – P. 1 – 8. doi:10.4172/2254-609X.100033

130. Wang Y. Study on the interaction of cefazolin and ceftriaxone with human serum albumin with multi-spectroscopic and docking methods. / Y. Wang, F. Huang, Y. Liu // *Spectrosc. Spectral Anal.* – 2017. – Vol. 37, № 4. –

P. 1205 – 1210. doi: 10.3964/j.issn.1000-0593(2017)04-1205-06

131. Binding interactions of pefloxacin mesylate with bovine lactoferrin and human serum albumin / J. Fan, X. Chen, Y. Wang, Ch. Fan, Zh. Shang // *J Zhejiang Univ Sci. B.* – 2006. – Vol. 7, № 6. – P. 452 – 458.

132. Spectroscopic investigations of the interaction of the anti-hypertension drug valsartan with human serum albumin / J. Jing, X. Qu, Zh. Tu, Ch. Zheng, Zh. Zheng // *Molecular Med. Reports.* – 2014. – Vol. 9. – P. 2191 – 2196.

133. Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA). / Y. Y. Lou, K. L. Zhou, D. Q. Pan, J. L. Shen, J. H. Shi. / *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* – 2017. – Vol. 167. – P. 158 – 167. doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.029

134. Machicote R. G. Binding of several benzodiazepines to bovine serum albumin: Fluorescence study. / R. G. Machicote, M. E. Pacheco, L. Bruzzone // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2010. – Vol. 77. – P. 466 – 472. doi:10.1016/j.saa.2010.06.020

135. Luminescence quenching effect for the interaction of prulifloxacin with trypsin–Britton–Robinson buffer solution system / H. Yabei, L. Benzhi, Y. Zhang, Z. Yanqin // *J. Luminesc.* – 2010. – Vol. 130. – P. 360 – 364.

136. Jianghong T. Spectroscopic studies of the interaction of anti-coagulant rodenticide diphacinone with human serum albumin / T. Jianghong, Q. Shengda, Ch. Xingguo // *J. Mol. Struct.* – 2005. – Vol. 779. – P. 87 – 95.

137. Analysis of binding interaction between puerarin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method. / J. Xiao, J. Shi, H. Cao, S. Wu, F. Ren, M. Xu // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 45, № 4. – P. 609 – 615.

138. Matei I. Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study / I. Matei, M. Hillebrand // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 51, № 3. – P. 768 – 773.

139. Trynda-Lemiesz L. Interactions of human serum albumin with

meloxicam: characterization of binding site. / L. Trynda-Lemiesz, K. Wiglusz // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol.52, № 2. – P. 300 – 304.

140. Study on interaction between a new fluorescent probe 2-methylbenzo[b][1,10]phenanthroline-7(12H)-one and BSA. / B. Qiu, L. Guo, M. Chen, Z. Lin, G. Chen // *Analyst.* – 2011. – Vol. 136. – P. 973 – 978.

141. Ni Y. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. / Y. Ni, R. Zhu, S. Kokot // *Analyst.* – 2011. – Vol. 136, № 22. – P. 4794 – 4801.

142. Chemicobiological deciphering the protein-binding details of aspirin / H. X. Xiong, H. L. Wang, H. X. Zhang, L.W. Li // *RRJPPS.* – 2016. – Vol. 5, № 2. – P. 21 – 30.

143. Interaction of avelox with bovine serum albumin and effect on the coexistent drugs on the reaction / B. Liu, C. Yang, X. Yan, J. Wang, Y. Lv // *Inter. J. Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 408057.

144. Investigation of interaction between bovine serum albumin and drugs by fluorescence spectrometry / Y. Bai, S. Sun, H. Zhang, T. Zhao // *Anal. Methods.* – 2013. – Vol. 5. – P. 7036 – 7041.

145. Markeb A. A. Simultaneous quantitation of 5- and 7-hydroxyflavone antioxidants and their binding constants with BSA using dual chiral capillary electrophoresis (dCCE) and HPLC with fluorescent detection. / A. A. Markeb, N. A. El-Maali // *Talanta.* – 2014. – Vol. 119. – P. 417 – 424.

146. Effects of urea, metal ions and surfactants on the binding of baicalein with bovine serum albumin. / A. S. Roy, A. K. Dinda, N. K. Pandey, S. Dasgupta // *J. Pharm. Anal.* – 2016. – Vol. 6. – P. 256 – 267.

147. Study of interaction between febuxostat and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. / S. N. I. Rabbi, M. Z. Sultan, M. D. Sohel, M. Z. Sultan // *J. Bioanal. Biomed.* – 2015. – Vol. 7, № 5. – P. 164 – 170.

148. Fluorescence spectroscopic study of interaction between olanzapine and

bovine serum albumin. / M. A. Rashid, S. N. I. Rabbi, T. Sultana, M. Z. Sultan, M. Z. Sultan // *Pharm. Anal. Acta.* – 2015. – Vol. 6, № 8. – P. 1000408.

149. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biological active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. / V. D. Suryawanshi, L. S. Walekar, A. H. Gore, P.V. Anbhule, G. B. Kolekar // *J. Pharm. Anal.*– 2016. – Vol. 6. – P. 56 – 63.

150. Spectroscopic study of the interaction between dipicolinic acid and human serum albumin./ M. Feliciano, M. Kroger, J. Irizarry, S. Prentzas, J. Fan, E. Wang // *J. Res. Anal.* – 2016. – Vol. 2, № 4. – P. 102 – 107.

151. Drug-protein binding mechanism of juglone for early pharmacokinetic profiling: Insights from ultrafiltration, multi-spectroscopic and molecular docking methods. / P. Zhao, G. Gao, L. Zhang, Q. Cai, N. Lu, L. Cheng, S. Li, X. Hou // *J. Pharmac. Biomed. Anal.* – 2017. – Vol. 141. – P. 262 – 269.

152. Zhang Q. Competitive interactions between glucose and lactose with BSA: which sugar is better for children? / Q. Zhang, Y. Ni, S. Kokot // *Analyst.* – 2016. – Vol. 141, № 7. – P. 2218 – 2227.

153. Spectroscopic and molecular modeling studies on binding of fleroxacin with human serum albumin. / C. Y. Dong, J. Xu, S. S. Zhou, Y. Liu // *Spectrosc. Spectral Anal.* – 2017.– Vol. 37, № 1.– P. 327 – 332.

154. Binding interaction of phosphorus heterocycles with bovine serum albumin: A biochemical study./ S. Roy, R. K. Nandi, S. Ganai, K. C. Majumdar, T. K. Das // *J. Pharm. Anal.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 19 – 26.

155. Interaction of cefminox with bovine serum albumin. / X. Liu, M. Su, P. Chen, H. Sun // *WJPPS.* – 2015. – Vol. 4, № 1.– P.100 – 115.

156. Interactions of cephalexin with bovine serum albumin: displacement reaction and molecular docking / H. Hamishehkar, S. Hosseini, A. Naseri, A. Safarnejad, F. Rasoulzadeh // *BioImpacts.* – 2016. – Vol. 6, № 3. – P. 125 – 133. doi: 10.15171/bi.2016.19

157. Investigation on the Interaction between cyclophosphamide and

lysozyme in the presence of three different kind of cyclodextrins: determination of the binding mechanism by spectroscopic and molecular modeling techniques / M. Mansouri, M. Pirouzi, M. Saberi, M. Ghaderabad, J. Chamani // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – P. 789 – 813. doi:10.3390/molecules18010789

158. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin / N. Wang, L. Ye, B. Q. Zhao, J. X. Yu // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2008. – Vol. 41. – P. 589 – 595.

159. Interaction between felodipine and bovine serum albumin: fluorescence quenching study / U. S. Mote, Bhattar S. L., Patil S. R., Kolekar G. B. // *Luminescence*. – 2010. – Vol. 25. – P. 1 – 8. doi 10.1002/bio.1130

160. Interaction of anesthetic supplement thiopental with human serum albumin / Sh. N. Khan, B. Islam, M. R. Rajeswari, H. Usmani, A. U. Khan // *Acta Biochim. Polonica*. – 2008. – Vol. 55, № 2. – P. 399 – 409.

161. Rehman M. T. Insight into the binding mechanism of imipenem to human serum albumin by spectroscopic and computational approaches / M. T. Rehman, H. Shamsi, A. U. Khan // *Mol. Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 11. – P. 1785 – 1797. dx.doi.org/10.1021/mp500116c |

162. Investigation of the interaction of naringin palmitate with bovine serum albumin: spectroscopic analysis and molecular docking / X. Zhang, L. Li, Zh. Xu, Zh. Liang, J. Su, J. Huang, B. Li // *PLOS One*. – 2013. – Vol. 8, № 3. – P. e59106.

163. Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir, a HIV protease inhibitor / J. H. Shi, K. L. Zhou, Y. Y. Lou, D. Q. Pan // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 188. – P. 362 – 371.

164. Binding study of diprophylline with lysozyme by spectroscopic methods / W. Wang, W. Min, J. Chen, X. Wua, Z. Hub // *J. Luminesc.* – 2011. – Vol. 131. – P. 820 – 824.

165. Spectroscopic and molecular docking techniques study of the interaction between oxymetholone and human serum albumin / T. Madrakian, H. Bagheri,

A. Afkhami, M. Soleimani // *J. Luminesc.* – 2014. – Vol. 155. P. 218 – 225.

166. Spectroscopic and molecular docking studies of binding interaction of gefitinib, lapatinib and sunitinib with bovine serum albumin (BSA) / G. F. Shen, T. T. Liu, Q. Wanga, M. Jiang, J. H. Shi // *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* – 2015. – Vol. 153. – P. 380 – 390.

167. Binding interaction of Ramipril with bovine serum albumin (BSA): Insights from multi-spectroscopy and molecular docking methods. / J. H. Shi, D. Q. Pan, M. Jiang, T. T. Liu, Q. Wang // *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* – 2016. – Vol. 164. – P. 103 – 111.

168. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking. / Q. Wang, Ch. R. Huang, M. Jiang, Y. Y. Zhu, J. Wang, J. Chen, J. H. Shi // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2016. – Vol. 156. – P. 155 – 163.

169. Синтез та протитуберкульозна активність метилзаміщених піридил-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбонових кислот / І. В. Українець, С. А. Ель Каяль, О. В. Горохова, Л. В. Сидоренко // *Фарм. журн.* – 2004. – № 4. – С. 47 – 53.

170. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: Мир, 1972. – 503 с.

171. Синтез і цитотоксичність аміноетоксидифенілів / С.О. Заноза, Г.В. Мальцев, С.А. Ляхов, С.А. Андронаті, М.Ю. Зубрицький, О.С. Богорад-Кобельська, О.В. Плотка, Н.М. Жолобак, М.Я. Співак // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії* – 2014. – Т. 12, вип. 3 (47). – С. 38 – 44.

172. Antonini I. 2,3-Dihydro-1H,7H-pyrimido[5,6,1-de]acridine-1,3,7-trione derivatives, a class of cytotoxic agents active on multidrug-resistant cell lines: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships / I. Antonini, P. Polucci, L.R. Kelland // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42, № 14. – P. 2535 – 2541.

173. Крамер Г. Математические методы статистики / Г. Крамер; [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1976. – 648 с.

174. Лакин Г.Ф. Биометрия: [уч. пособие] / Г. Ф. Лакин М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

175. Valeur B. New Trends in Fluorescence Spectroscopy 6th edn. / Valeur B., Brochon J.C. Berlin: Springer, 1999. С. 25–28.

176. Ross P. D. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability. / P. D. Ross, S. Subramanian // Biochemistry. – 1981. – Vol. 20. – P. 3096–3102. <http://dx.doi.org/10.1021/bi00514a017>

177. Miller J.N. Recent advances in molecular luminescence analysis / J.N. Miller // Proc. Anal. Div. Chem. Soc. – 1979. – Vol. 16, №. 7. – P. 203–208.

178. Binding interaction of indomethacin with human serum albumin / M. Bogdan, A. Pirnau, C. Floare, C. Bugeac // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – Vol. 47. – P. 981 – 984.

179. PDB: 3UIV Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin Curry, S. TO BE PUBLISHED.

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского
НАН Украины

Академик
НАН Украины



С.А. Андронаті

2018 г.

«Утверждаю»

Генеральный директор ОДО

«ИНТЕРХИМ»



А.С. Редер

2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» методики флуоресцентного определения остаточных количеств пропоксазепам (БД007) в смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования (МКК 06.5/1-125.1-842), разработанной в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец и в ОДО «ИНТЕРХИМ» заведующим лабораторией НИЛФХМ Г.В. Мальцевым.

Методика отличается высокой чувствительностью и экспрессностью, позволяет определять микроколичества пропоксазепам в смывах.

От ФХИ НАН Украины

Вед.н.с., д.х.н.  А.В. ЕгороваН.с., к.х.н.  Ю.В. Скрипинец

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР

С.Н. Кашуцкий

Зав. лабораторией НИЛФХМ

Г.В. Мальцев

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского

НАН Украины

Академик

НАН Украины

«22»



С.А. Андронати

2018 г.

«Утверждаю»

Генеральный директор

ОДО

«ИНТЕРХИМ»

А.С. Редер



03

2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» результатов флуоресцентного исследования взаимодействия лекарственных веществ (тилорон, левана, феназепам, гизазепам, диазепам, пропоксазепам) с сывороточным альбумином человека (САЧ), (отчеты ОИЛ 06.8-125.1-185/17, ОИЛ 06.8-125.1-185/17, ОИЛ 06.8-125.1-186/17), проведенного в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец и в ОДО «ИНТЕРХИМ» заведующим лабораторией НИЛФХМ Г.В. Мальцевым.

Установлены константы и число мест связывания в системах лекарственное вещество-САЧ. Используя теорию резонансного переноса энергии, установлено среднее расстояние между донорными и акцепторными молекулами. Результаты этих биоаналитических исследований необходимы и полезны для фармацевтического производства.

От ФХИ НАН Украины

Вед. н.с., д.х.н.  А.В. Егорова

Н.с., к.х.н.

 Ю.В. Скрипинец

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР

С.Н. Кашуцкий

Зав. лабораторией НИЛФХМ 

Г.В. Мальцев

Список публікацій здобувача:

1. Новый люминесцентный зонд на основе комплекса тербия (III) для изучения аффинитета к ДНК аминокислот флуоренонов / 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 Scrypynets, **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. Scrypynets, **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 долутегавира 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 даклатасвира 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. Scrypynets, **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 даклатасвира дигидрохлорида с сывороточным альбумином человека / А. А. Федосенко, **Г. В. Мальцев**, Ю. В. Скрипинець, 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. Scrypynets, V. Antonovich // Book of abstracts of 8 th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BBCAC) – Istanbul-Turkey, 9-11 May, 2018. – P. 188.