

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

ГОЛОВКО ОКСАНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 539.2;538.9;548

ДИСЕРТАЦІЯ  
**МЕХАНІЗМИ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ  
АНТИОКСИДАНТНИХ МЕДИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ З  
ТРАНСПОРТНИМИ ПРОТЕЇНАМИ**

104 – фізика та астрономія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

\_\_\_\_\_ О.О. Головка

Науковий керівник:  
**Дмитренко Оксана Петрівна**  
доктор фіз.-мат. наук, професор

Київ – 2025

## Анотація

Головко О.О. «Механізми комплексоутворення антиоксидантних медичних препаратів з транспортними протеїнами». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі природничих наук за спеціальністю 104 – фізика та астрономія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Київ, 2025.

Досліджено гасіння флуоресценції фізіологічних розчинів БСА- $\text{CeO}_2$ , що підтвердило статичний характер комплексоутворення з високою константою зв'язування. Визначено середню відстань між триптофаном і наночастинками, що узгоджується з розрахунками молекулярного моделювання. Розрахунки термодинамічних характеристик показали, що формування комплексів БСА- $\text{CeO}_2$  зумовлене переважно ван-дер-ваальсовими взаємодіями та водневими зв'язками.

Для комплексів ЛСА-куркумін та ЛСА-кверцетин встановлено, що куркумін утворює зв'язки, де основну роль відіграють водневі зв'язки. Аналогічна тенденція спостерігається у розчинах БСА-куркумін та БСА-кверцетин, де для куркуміну переважають гідрофобні взаємодії, а для кверцетину – водневі зв'язки. Метод молекулярної динаміки дозволив ідентифікувати ключові залишки амінокислот у комплексах: для БСА-куркуміну – Leu-115, Pro-117, Leu-122, Phe-133, а для БСА-кверцетину – Asp-108 та His-145 ( $\pi$ - $\pi$  стекінг).

Отримані результати дозволяють краще зрозуміти механізми комплексоутворення білків з наночастинками та біоактивними сполуками, що є перспективним для біомедичних застосувань.

**Метою** даної роботи є вивчення механізмів комплексоутворення у розчинах БСА та ЛСА з лікарськими препаратами, а саме кверцетином, куркуміном та антиоксидантними наночастинками  $\text{CeO}_2$  з встановленням

параметрів взаємодії у комплексах та визначенням механізмів гетероасоціації.

**Об'єктом** досліджень є комплекси БСА та ЛСА з лікарськими препаратами кверцетином, куркуміном та антиоксидантними наночастинками  $\text{CeO}_2$ .

**Предметом** досліджень є вивчення процесів комплексоутворення БСА та ЛСА з лікарськими препаратами кверцетином, куркуміном та наночастинками  $\text{CeO}_2$ , визначення параметрів взаємодії, параметрів зв'язування та механізмів формування гетероасоціатів.

В дисертації - **вперше** показано, що використання малих розмірів наночастинок діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  в розчинах з БСА приводить до значних величин констант зв'язування та числа місць зв'язування  $n \approx 2$ ;

- **вперше** показано, що мають місце відмінності в параметрах гетероасоціації протеїнів БСА і ЛСА з антиоксидантними лікарськими препаратами кверцетину і куркуміну, які зумовлені різною структурою білків та лікарських засобів;

- **вперше** при застосуванні теорії Фьорстера отримано, що механізм резонансної безвипромінювальної передачі енергії є більшим істотним в системі БСА-Куркумін як наслідок значної гідрофобної взаємодії;

- **вперше** показано відмінності між механізмами взаємодії протеїнів БСА і ЛСА та медичних препаратів куркуміну та кверцетину, які вказують на переважаючий гідрофобний внесок в системах з БСА;

- **вперше** при моделюванні методом молекулярної динаміки показано, що при комплексоутворенні в системі ЛСА-Куркумін важливе місце займає перебудова вторинної структури.

**Ключові слова:** БСА, ЛСА, кверцетин, куркумін, наночастинки  $\text{CeO}_2$ , гасіння флуоресценції, параметри зв'язування, комплекси, термодинамічні параметри.

## Список публікацій здобувача

**Праці, в яких опубліковано основні результати дисертації:**

1. **Honcharova O. O.** Binding parameters and conjugation mechanisms in the solutions of BSA with antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles/ **O. O. Honcharova**, O. P. Dmytrenko, A. I. Lesiuk, M. P. Kulish, O. L. Pavlenko, A. P. Naumenko, I. Yu. Doroshenko, N. M. Zholobak, M. I. Kaniuk// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*–2023.–P.144–154. <https://doi.org/10.1080/15421406.2022.2073044> (Scopus, Q4)
2. **Holovko O.O.** Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin/ **O.O. Holovko**, O.P.Dmytrenko, A.I. Lesiuk, M.P. Kulish, O.L. Pavlenko, A.P. Naumenko, T.M. Pinchuk-Rugal, M. I.Kaniuk, T.O. Veklish// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*– 2024. – P.1–15. <https://doi.org/10.1080/15421406.2023.2238505> (Scopus, Q4)
3. **Holovko O.** Human serum albumin and curcumin heteroassociate in aqueous solutions/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesiuk, M. Kaniuk, A. Naumenko, O. Pavlenko, I. Doroshenko// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*–2024.–V.768, NO. 14. –P.638–652. <https://doi.org/10.1080/15421406.2024.2355396> (Scopus, Q4).
4. **Holovko O.** Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin/ O. Holovko, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesiuk, O. Pavlenko, A. Naumenko, M. Kaniuk, I. Doroshenko // *Journal of Molecular Liquids.*–2024.–V. 415, №126364.–P.1–12. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.126364> (Scopus, Q1)
5. **Holovko O.** Complexation of HSA with the Medicine Quercetin/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesyuk, M. Kanyuk, A. Naumenko, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Misiura // *Nanooptics and Nanoelectrics*,

Nanobiotechnology, and Their Applications, Springer Proceedings in Physics.–2024.–V.312–P.131–149.

[https://doi.org/10.1007/978-3-031-67527-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-031-67527-0_11) (Scopus)

### Праці апробаційного характеру:

1. **Honcharova O.O.** Spectral properties of cerium dioxide nanoparticles/  
**O.O. Honcharova**, O.P. Dmytrenko, M.P. Kulish, N.M. Zholobak, A.P. Naumenko, O.L. Pavlenko, D.R. Olesh// Proceedings of X International Conference “Medical Physics – the Current Status, Problems, the Way of Development. Innovation Technologies”. – 2021. – Київ, Україна. – P. 84– 87.
2. **Honcharova O.O.** Modeling of complexes of serum albumin with CeO<sub>2</sub> nanoparticles/  
**O.O. Goncharova**, M.P. Kulish, O.P. Dmytrenko, A.I. Lesiuk, O.L. Pavlenko, I.P. Pundyk, T.M. Pinchuk-Rugal, A.P. Naumenko, N.M. Zholobak, M.I. Kanyuk // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021). – Lviv: LPNU.–2021.–P. 314.
3. **Honcharova O.O.** Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin/  
**O.O. Goncharova**, O.P. Dmytrenko, A.I. Lesiuk, M.P. Kulish, O.L. Pavlenko, M.I. Kanyuk // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2022). – Lviv: LPNU.–2022.–P. 336.
4. 1. **Holovko O.** Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin/  
**O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk, T. Veklich // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 397.

2. **Holovko O.** The complex formation of HSA with the medicine quercetin/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk// Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 398.

3. **Holovko O.** The human serum albumin and the medicine curcumin heteroassociation in aqueous solutions/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk// Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 401.

## Abstract

Holovko O.O. “Mechanisms of complexation of antioxidant drugs with transport proteins.” - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the degree of Philosophy Doctor in the field of natural sciences in a specialty 104 – Physics and astronomy. – Taras Shevchenko National University of Kyiv. Kyiv, 2025.

Fluorescence quenching of physiological BSA-CeO<sub>2</sub> solutions was studied, confirming the static nature of the complex formation with a high binding constant. The average distance between tryptophan and nanoparticles was determined, which agrees with the molecular modeling calculations. Thermodynamic calculations showed that the formation of BSA-CeO<sub>2</sub> complexes is primarily driven by van der Waals interactions and hydrogen bonds.

For HSA-curcumin and HSA-quercetin complexes, it was found that curcumin forms complexes where hydrogen bonds play a dominant role. A similar trend is observed in BSA-curcumin and BSA-quercetin solutions, where hydrophobic interactions predominate for curcumin, while hydrogen bonds are crucial for quercetin. Molecular dynamics simulations allowed the identification of key amino acid residues involved in the complexes: Leu-115, Pro-117, Leu-122, and Phe-133 for BSA-curcumin, and Asp-108 and His-145 ( $\pi$ - $\pi$  stacking) for BSA-quercetin.

The obtained results provide a better understanding of the mechanisms of complex formation between proteins, nanoparticles, and bioactive compounds, which is promising for biomedical applications.

**The aim** of the study is to investigate the spectra of optical density and fluorescence quenching, changes in thermodynamic parameters and energy transfer mechanism for solutions of bovine and human serum albumin with curcumin and quercetin, as well as cerium dioxide nanoparticles with bovine serum albumin.

**The aim** of this work is to study the mechanisms of complex formation in BSA and HSA solutions with pharmaceutical compounds, namely quercetin, curcumin, and antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles, with the determination of interaction parameters in the complexes and the identification of heteroassociation mechanisms.

**The object** of the study is the complexes of BSA and HSA with pharmaceutical compounds quercetin, curcumin, and antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles.

**The subject** of the study is the investigation of the complex formation processes between BSA and HSA with pharmaceutical compounds quercetin, curcumin, and CeO<sub>2</sub> nanoparticles, determination of interaction parameters, binding parameters, and the mechanisms of heteroassociation formation.

In the work, it is shown **for the first time** that:

- The use of small CeO<sub>2</sub> nanoparticle sizes in BSA solutions leads to significant binding constant values and the number of binding sites  $n \approx 2$ .

- **for the first time**, it is shown that there are differences in the parameters of heteroassociation between the proteins BSA and HSA with antioxidant pharmaceutical compounds quercetin and curcumin, which are due to the different structures of the proteins and pharmaceutical compounds.

- **for the first time**, using Förster's theory, it is obtained that the mechanism of resonance non-radiative energy transfer is significantly greater in the BSA-curcumin system due to the considerable hydrophobic interaction.

- **for the first time**, differences between the interaction mechanisms of BSA and HSA proteins with curcumin and quercetin are shown, indicating the dominant hydrophobic contribution in BSA-based systems.

- **for the first time**, molecular dynamics modeling shows that during complex formation in the HSA-curcumin system, the rearrangement of the secondary structure plays an important role.

**Key words:** : BSA, HSA, quercetin, curcumin, CeO<sub>2</sub> nanoparticles, fluorescence quenching, binding parameters, complexes, thermodynamic parameters.

## List of publications

### Works in which the main results of the dissertation were published:

1. **Honcharova O.O.** Binding parameters and conjugation mechanisms in the solutions of BSA with antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles/ **O. O. Honcharova**, O. P. Dmytrenko, A. I. Lesiuk, M. P. Kulish, O. L. Pavlenko, A. P. Naumenko, I. Yu. Doroshenko, N. M. Zholobak, M. I. Kaniuk// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*–2023.–P.144–154. <https://doi.org/10.1080/15421406.2022.2073044> (Scopus, Q4)
2. **Holovko O.O.** Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin/ **O.O. Holovko**, O.P.Dmytrenko, A.I. Lesiuk, M.P. Kulish, O.L. Pavlenko, A.P. Naumenko, T.M. Pinchuk-Rugal, M. I.Kaniuk, T.O. Veklish// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*– 2024. – P.1–15. <https://doi.org/10.1080/15421406.2023.2238505> (Scopus, Q4)
3. **Holovko O.** Human serum albumin and curcumin heteroassociate in aqueous solutions/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesiuk, M. Kaniuk, A. Naumenko, O. Pavlenko, I. Doroshenko// *Molecular Crystals and Liquid Crystals.*–2024.–V.768, NO. 14. –P.638–652. <https://doi.org/10.1080/15421406.2024.2355396> (Scopus, Q4).
4. **Holovko O.** Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesiuk, O. Pavlenko, A. Naumenko, M. Kaniuk, I. Doroshenko // *Journal of Molecular Liquids.*–2024.–V. 415, №126364.–P.1–12. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.126364> (Scopus, Q1)
5. **Holovko O.** Complexation of HSA with the Medicine Quercetin/ **O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesyuk, M. Kanyuk, A. Naumenko, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Misiura // *Nanooptics and Nanoelectrics, Nanobiotechnology, and Their Applications, Springer Proceedings in Physics.*–2024.–V.312–P.131–149. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-67527-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-031-67527-0_11) (Scopus)

### Approbation works:

1. **Honcharova O.O.** Spectral properties of cerium dioxide nanoparticles/  
**O.O. Honcharova**, O.P. Dmytrenko, M.P. Kulish, N.M. Zholobak, A.P. Naumenko, O.L. Pavlenko, D.R. Olesh// Proceedings of X International Conference “Medical Physics – the Current Status, Problems, the Way of Development. Innovation Technologies”. – 2021. – Київ, Україна. – P. 84– 87.
2. **Honcharova O.O.** Modeling of complexes of serum albumin with CeO<sub>2</sub> nanoparticles/  
**O.O. Goncharova**, M.P. Kulish, O.P. Dmytrenko, A.I. Lesiuk, O.L. Pavlenko, I.P. Pundyk, T.M. Pinchuk-Rugal, A.P. Naumenko, N.M. Zholobak, M.I. Kanyuk // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021). – Lviv: LPNU.–2021.–P. 314.
3. **Honcharova O.O.** Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin/  
**O.O. Goncharova**, O.P. Dmytrenko, A.I. Lesiuk, M.P. Kulish, O.L. Pavlenko, M.I. Kanyuk // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2022). – Lviv: LPNU.–2022.–P. 336.
4. 1. **Holovko O.** Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin/  
**O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk, T. Veklich // Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 397.  
  
2. **Holovko O.** The complex formation of HSA with the medicine quercetin/  
**O. Holovko**, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk// Book of abstracts

international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 398.

3. **Holovko O.** The human serum albumin and the medicine curcumin heteroassociation in aqueous solutions/ **O. Holovko, O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, I. Doroshenko, A. Lesiuk, A. Naumenko, M. Kanyuk**// Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). – Lviv: LPNU.–2023.–P. 401.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	21
1.1. Будова та властивості БСА .....	21
1.2. Будова та властивості ЛСА.....	25
1.3. Комплексоутворення БСА та ЛСА з медичними препаратами.....	30
1.4. Властивості антиоксидантних наночастинок діоксида церію CeO <sub>2</sub> .....	33
1.5. Властивості антиоксидантних лікарських препаратів куркуміну та кверцетину.....	36
1.6. Комп'ютерне моделювання комплексів протеїнів з медичними препаратами та наночастинками .....	43
РОЗДІЛ 2 .МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ .....	48
2.1. Матеріали та приготування розчинів .....	48
2.2 Методи спектральних досліджень розчинів .....	49
2.2.1. Оптичне поглинання .....	49
2.2.2. Флуоресценція гасіння та збудження .....	51
2.3. Методи визначення параметрів комплексоутворення.....	53
2.4. Комп'ютерне моделювання.....	54
РОЗДІЛ 3. КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БСА З ДІОКСИДОМ ЦЕРІЮ CeO <sub>2</sub> .....	57
3.1. Оптичні властивості БСА при взаємодії з наночастинками CeO <sub>2</sub> : поглинання та флуоресценція.....	57

3.2. Моделювання взаємодії альбумінів з наночастинками $\text{CeO}_2$ .....	63
3.3. Встановлення параметрів гасіння та зв'язування в розчинах БСА з наночастинками $\text{CeO}_2$ .....	72
3.4. Термодинамічні характеристики розчинів БСА з наночастинками $\text{CeO}_2$ .....	77
РОЗДІЛ 4.КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ЛСА З КВЕРЦЕТИНОМ ТА КУРКУМІНОМ.....	81
4.1. Сайти зв'язування в розчинах у водних розчинах ЛСА-кверцетин та ЛСА-куркумін .....	81
4.2. Параметри зв'язування у водних розчинах ЛСА-кверцетин ...	84
4.3. Зміни термодинамічних параметрів приклад комплексу утворення у водних розчинах ЛСА-кверцетин та ЛСА-куркумін.....	101
4.4. Механізм перенесення енергії в комплексах ЛСА-Кверцетин та ЛСА-Куркумін .....	103
РОЗДІЛ 5.КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БСА З КВЕРЦЕТИНОМ ТА КУРКУМІНОМ.....	115
5.1. Гетероасоціація та параметри взаємодії в комплексах БСА -кверцетин та БСА – куркумін.....	115
5.2. Зміни термодинамічних параметрів комплексоутворення у водних та механізм перенесення енергії в комплексах БСА-кверцетин та БСА-куркумін.....	125
5.3. Комп'ютерне моделювання БСА-кверцетин та БСА-куркумін .....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	115

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- BSA – бичачий сироватковий альбумін
- LCA – людський сироватковий альбумін
- НОМО- вища зайнята молекулярна орбіталь
- LUMO - найнижча незайнята молекулярна орбіталь
- $\lambda$ - довжина хвилі збудження
- T- температура
- Trp – триптофан (Tryptophan)
- Tyr – тирозин (Tyrosine)
- Phe – фенілаланін (Phenylalanine)
- Cys – цистеїн (Cysteine)
- Arg – аргінін (Arginine)
- Ser – серин (Serine)
- НЧ – наночастинки
- НОЦ – наночастинки оксиду церію
- $\Delta G$  – зміна вільної енергії Гіббса
- $\Delta S$  – зміна ентропії
- $\Delta H$  – зміна ентальпії
- DMSO – диметилсульфоксид
- FRET – флуоресцентний резонансний енергетичний перенос (Förster resonance energy transfer)
- РОФ - рофлуміласт

## ВСТУП

Вивчення доставки ліків є важливою фізичною задачею, яка передбачає встановлення механізмів доставки, як наслідку комплексоутворення з транспортними протеїнами.

Серед лікарських препаратів важливе значення мають антиоксидантні препарати: наночастинки діоксиду церію, куркумін, кверцетин. Наночастинки  $\text{CeO}_2$  характеризуються антиоксидантними, антибактеріальними, протизапальними та протипухлинними властивостями. Завдяки низькій токсичності наночастинок, особливо розміром до 6 нм, вони є перспективним терапевтичним агентом для біомедичного застосування в радіотерапії ракових захворювань, редокс- та хіміотерапії. Кверцетин належить до флавоноїдів та проявляє високу фармакологічну, антимікробну, протизапальну, імуносупресивну дію. Ефективність антиоксидантної терапевтичної дії кверцетину пов'язана з його спроможністю інгібування реактивних форм кисню, поглинанням вільних радикалів та хелатуванням перехідних іонів металів. Куркумін є фенольною структурою, багатofункціональним антиоксидантом та застосовується в медицині для лікування інфекційних, запальних, дерматологічних, серцево-судинних та ракових захворювань. Гідрофобність та низька розчинність даних лікарських препаратів зумовлює необхідність вирішення проблеми доставки ліків в організмі.

Визначення кількісних параметрів зв'язування та механізмів гетероасоціації антиоксидантних лікарських засобів з транспортними протеїнами є *актуальною задачею* для підсилення біосумісних характеристик ліків.

Комп'ютерне моделювання дозволяє визначити найближче оточення залишків амінокислот протеїнів з лікарськими засобами та тип зв'язку цих об'єктів. Це дає можливість моделювати конформації зв'язування молекул

ліганда з молекулою мішені та визначити основні біохімічні процеси при взаємодії молекул.

Метою даної роботи є вивчення процесів комплексоутворення у розчинах БСА та ЛСА з лікарськими препаратами куркуміном та кверцетином, а також антиоксидантними наночастинками  $\text{CeO}_2$ , визначення параметрів взаємодії та встановлення механізмів утворення гетероасоціатів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась в рамках держбюджетної теми МОН 22БФ051-03 «Радіаційна функціоналізація електропровідності і кон'югації в полімерних системах з наноприсадками».

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи є вивчення процесів комплексоутворення протеїнів БСА та ЛСА з антиоксидантними наночастинками діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  та лікарськими засобами кверцетину і куркуміну, визначення параметрів зв'язування при використанні гасіння флуоресценції та встановлення механізмів їх гетероасоціації.

Для досягнення поставленої мети було виконано *наступні завдання*:

- приготування водних розчинів БСА, ЛСА, БСА з наночастинками діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  з різними концентраціями, БСА та ЛСА з лікарськими препаратами кверцетину та куркуміну з різними концентраціями;
- вимірювання спектрів оптичного поглинання для вказаних розчинів;
- вивчення флуоресценції емісії та флуоресценції збудження при різних температурах;
  - визначення констант гасіння флуоресценції;
  - встановлення параметрів зв'язування між компонентами розчинів:

- використання теорії Фьорстера для встановлення параметрів резонансної безвипромінювальної передачі енергії, визначення механізмів зв'язування вказаних гетероасоціатів;

- проведення квантово-хімічних розрахунків електронного стану молекул медичних препаратів;

- виконання комп'ютерних розрахунків методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки.

**Об'єктом** досліджень є комплекси протеїнів БСА і ЛСА з антиоксидантними наночастинками діоксиду церію та лікарських засобів кверцетину та куркуміну.

**Предметом** досліджень є вивчення фізичних закономірностей утворення комплексів БСА, ЛСА з діоксидом церію  $\text{CeO}_2$ , кверцетином і куркуміном, визначення параметрів зв'язування та встановлення механізмів гетероасоціації.

**Методи дослідження:** дослідження оптичної густини розчинів у воді БСА, ЛСА з різними концентраціями антиоксидантних наночастинок діоксиду церію  $\text{CeO}_2$ , кверцетину і куркуміну, емісії флуоресценції та флуоресценції збудження, проведення комп'ютерного моделювання вказаних систем методом квантової хімії, молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, проведення досліджень резонансної безвипромінювальної передачі енергії з використанням теорії Фьорстера, визначення змін термодинамічних характеристик вільної енергії Гіббса, ентальпії і ентропії при утворенні комплексів водних розчинів для встановлення механізмів гетероасоціації.

**Наукова новизна отриманих результатів:**

- вперше показано, що використання малих розмірів наночастинок діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  в розчинах з БСА приводить до значних величин констант зв'язування та числа місць зв'язування  $n \approx 2$ ;

- вперше показано, що мають місце відмінності в параметрах гетероасоціації протеїнів БСА і ЛСА з антиоксидантними лікарськими препаратами кверцетину і куркуміну, які зумовлені різною структурою білків та лікарських засобів;

- вперше при застосуванні теорії Фьорстера отримано, що механізм резонансної безвипромінювальної передачі енергії є більшим істотним в системі БСА-Куркумін як наслідок значної гідрофобної взаємодії;

- вперше показано відмінності між механізмами взаємодії протеїнів БСА і ЛСА та медичних препаратів куркуміну та кверцетину, які вказують на переважаючий гідрофобний внесок в системах з БСА;

- вперше при моделюванні методом молекулярної динаміки показано, що при комплексоутворенні в системі ЛСА-куркумін важливе місце займає перебудова вторинної структури.

**Практичне значення одержаних результатів.** Дослідження взаємодії між лікарськими препаратами та протеїнами є перспективним, оскільки розкриває механізми дії ліків та розширює можливості створення нових препаратів. Встановлені параметри взаємодії в комплексах та роль різних взаємодій у процесах комплексоутворення може бути використана в області розробки та більш ефективного біомедичного застосування антиоксидантних препаратів у лікувальній практиці.

**Особистий внесок здобувача.** Авторка брала участь у формулюванні мети та завдань дослідження, аналізі наукових публікацій по темі роботи, приготуванні розчинів, обробці та узагальненні отриманих експериментальних даних спектроскопії, а також у написанні статей і тез доповідей. Експериментальну частину досліджень виконано в повному обсязі.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи було представлено на наукових конференціях: X International Conference

“Medical Physics – the current Status, Problems, the Way of Development. Innovation Technologies” (Київ, Україна 2021); International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2021), (Львів, Україна 2021); International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (NANO-2022), (Львів, Україна 2022); International research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023) (Львів, Україна 2023).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 9 наукових праць, з них 5 статей, в тому числі 3 статті у наукометричній базі Scopus (Q4 та Q1), 2 розділи монографій у наукометричній базі Scopus і 4 тези доповідей конференцій.

Дисертація складається із вступу, **п’яти розділів**, висновків, списку використаних джерел; на 159 сторінках містить 70 рисунків, 18 таблиць, списку використаних джерел з 152 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Будова та властивості БСА

Сироваткові альбуміни, які містяться в плазмі крові, часто називають транспортними білками через їх здатність переносити велику кількість екзогенних і ендогенних сполук під час циркуляції в організмі. Найкраще дослідженими з них є бичачий сироватковий альбумін (БСА) та людський сироватковий альбумін (ЛСА). Ці білки відзначаються високою конформаційною гнучкістю, що дозволяє їм ефективно зв'язувати різноманітні ліганди (1).

Альбумін є основним білком плазми крові як у людей, так і у тварин. Він відіграє ключову роль у підтримці осмотичного тиску крові та формуванні стійких комплексів із різноманітними речовинами, включаючи жирні кислоти, гормони, амінокислоти, жовчні кислоти, метали, лікарські засоби, природні сполуки та ксенобіотики(2). Це суттєво впливає на розподіл, виведення цих молекул і їх фармакокінетичні характеристики (3).

Молекула БСА складається з 583 амінокислот, що формують єдиний поліпептидний ланцюг. В її складі наявні 17 цистинових залишків, які утворюють вісім дисульфідних зв'язків та одну вільну тіолову групу. Молекулярна маса БСА становить 66 400 Да (4).

Структура бичачого сироваткового альбуміну (БСА) включає 9 петель, які організовані в триплетній манері, формуючи три гомологічні домени. Кожен домен складається з трьох петель, що забезпечує стабільність білка та його функціональні властивості. У складі БСА є два залишки триптофану (Trp 134 і Trp 213), а також залишки тирозину (Tyr) і фенілаланіну (Phe). Trp 134 розташований на поверхні субдомена ІВ і є

більш чутливим до зовнішніх впливів, тоді як Trp 213 знаходиться в гідрофобній порожнині субдомена ІА, що робить його більш стабільним (рис. 1.1) (5).

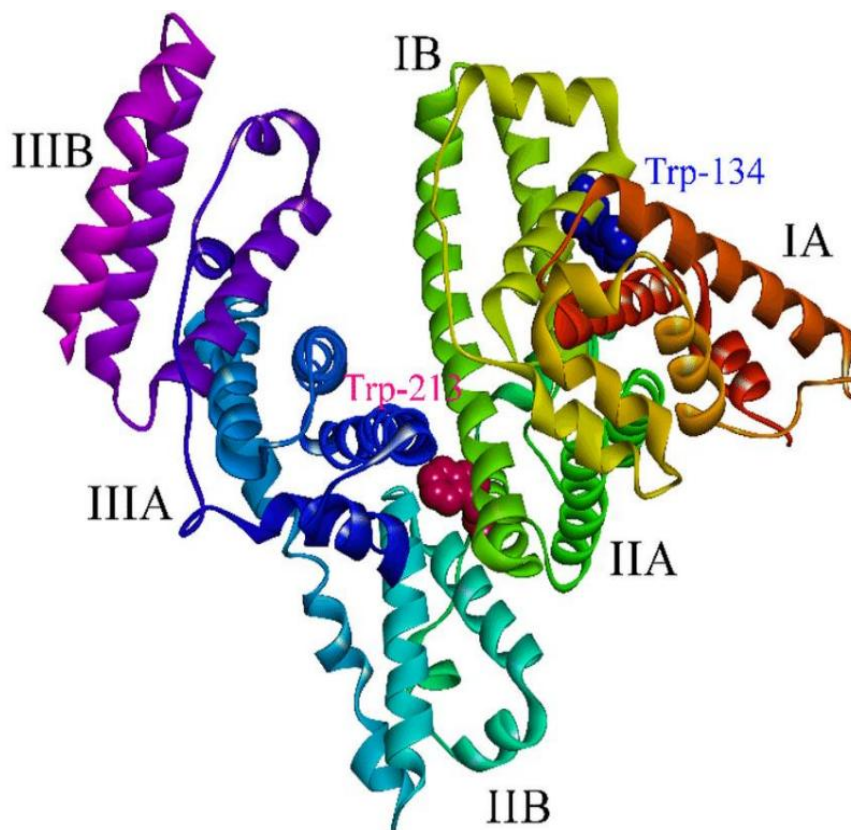


Рис. 1.1. Кристалографічна структура БСА (6).

Два триптофанові залишки в молекулі БСА дозволяють вивчати цей білок за допомогою флуоресцентного аналізу (рис.1.2), зокрема шляхом дослідження його власної флуоресценції (7).

На рис.1.3. показані спектри поглинання ультрафіолетового (УФ) випромінювання розчину БСА за різних умов: у відсутності (а–в) та у присутності наночастинок (НЧ) золота (г–е) при рН 2, 6 та 9 відповідно. Для порівняння також наведено еталонний спектр (є) НЧ золота в розчині. Розчин БСА має характерну смугу поглинання в УФ-діапазоні близько 278 нм, яка зумовлена електронними переходами ароматичних амінокислот. Ця смуга

змінюється в залежності від рівня рН, що свідчить про чутливість білка до змін у навколишньому середовищі (8).

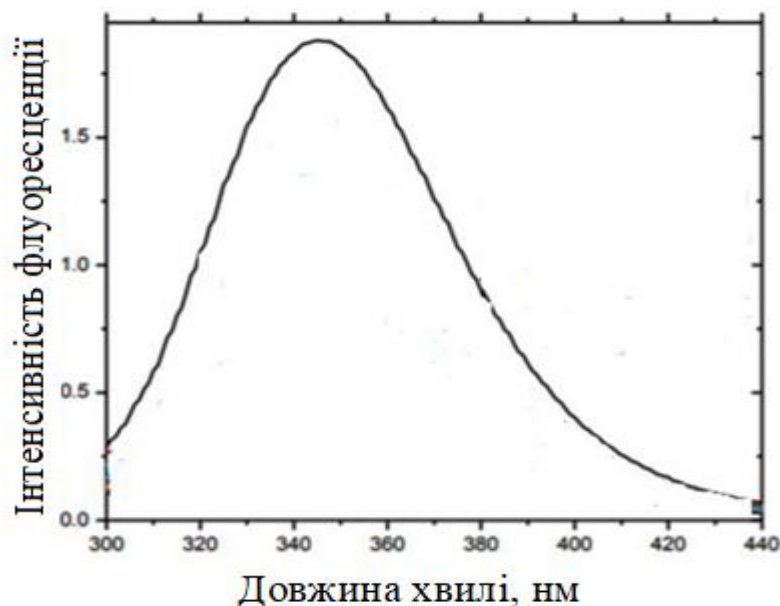


Рис.1.2. Спектри флуоресценції бичачого сироваткового альбуміну у буферному розчині PBS – рН 7,4 і  $T = 298$  К,  $\lambda_{36} = 280$  нм (9).

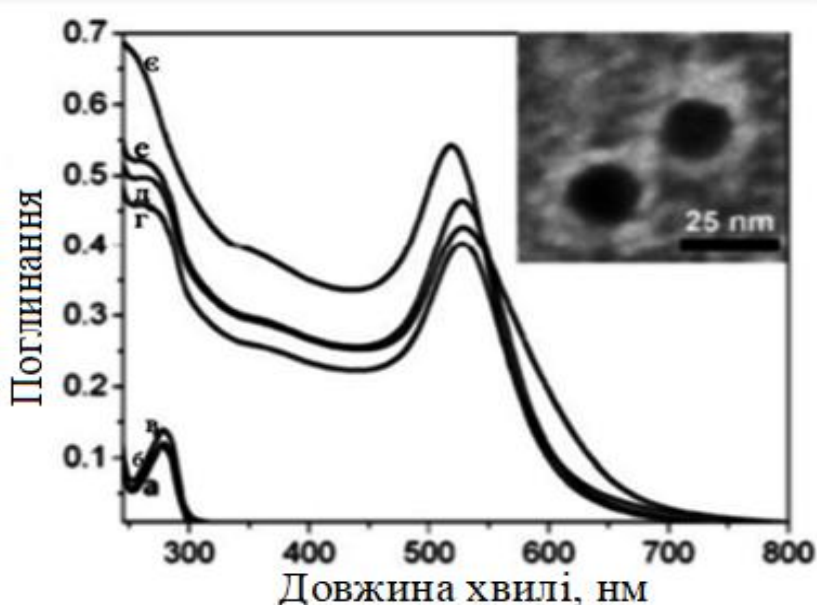


Рис. 1.3. Спектри поглинання розчину БСА без наночастинок золота (спектри а-в) та з присутністю НЧ золота (спектри г-е) при рН 2, 6 та 9 відповідно; спектр (е) представляє собою спектр поглинання готових НЧ золота в розчині. На вставці зображено репрезентативне зображення ТЕМ біокон'югату БСА-НЧ золота при рН=6 (8).

Оптичне поглинання БСА (рис.1.4) в основному зумовлене наявністю пептидних зв'язків, які утворюють структуру білка. Ці зв'язки мають виражену смугу поглинання в ультрафіолетовому діапазоні, що знаходиться між 190–280 нм. Цю смугу називають "смугою поглинання пептидного зв'язку".

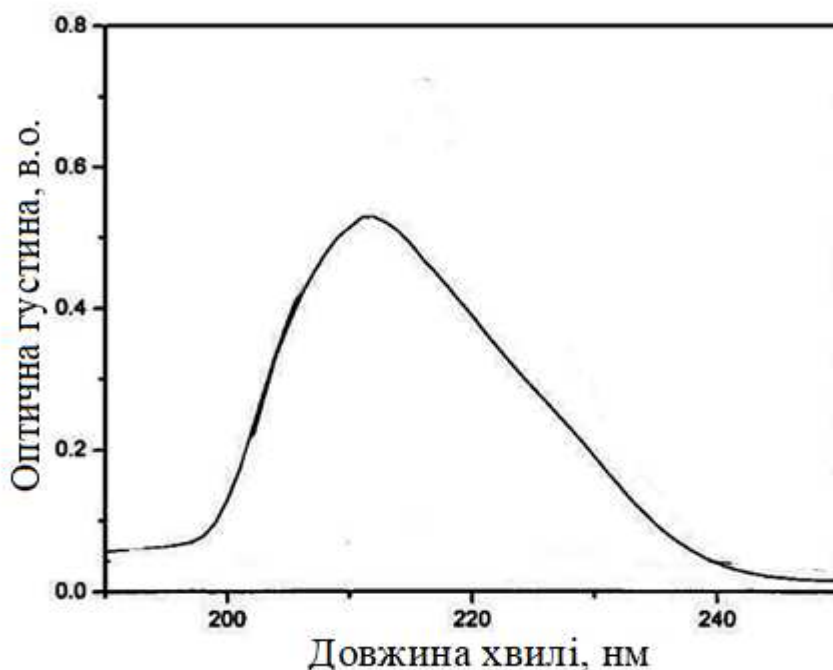


Рис. 1.4. Спектр поглинання бичачого сироваткового альбуміну, рН = 7,2 (10)

Спектр флуоресцентного випромінювання БСА (рис.1.5) зазвичай має пік приблизно при 340–350 нм, що зумовлено залишками триптофану. Інтенсивність цього випромінювання залежить від різних чинників, таких як рівень рН, температура та присутність інших молекул(11,12), здатних взаємодіяти з БСА.

Одним із основних зовнішніх факторів, що впливає на конформацію БСА в розчині, є рівень рН. Він визначає заряд функціональних груп білка і може спричинити зв'язування наночастинок у розчині. Заряд молекули БСА залежить від рН розчину: він є позитивним при  $\text{pH} < \text{pI}$ , нейтральним при  $\text{pH} = \text{pI}$ , і негативним при  $\text{pH} > \text{pI}$ , де  $\text{pI}$  — ізоелектрична точка білка (для БСА вона становить 4,7) (13).

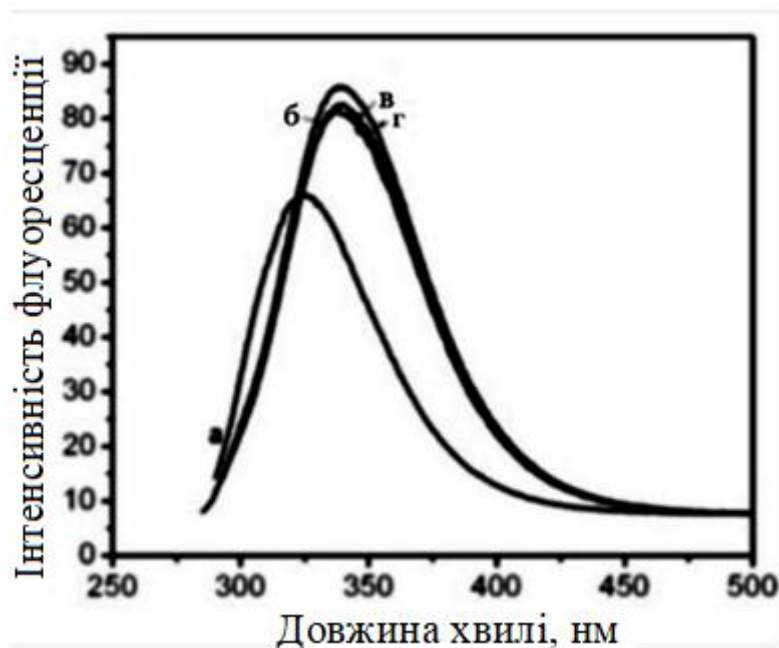


Рис. 1.5. Спектр флуоресценції БСА при рН2(а), рН5(б), рН 6(в), рН 7(г) (13).

Флуоресцентні властивості БСА можна досліджувати за допомогою флуоресцентної спектроскопії (14). Цей метод дозволяє отримати важливу інформацію про структуру і функції білка, а також є корисним для аналізу білкових взаємодій, зв'язування лігандів та дослідження інших біологічних процесів (9,15).

## 1.2. Будова та властивості ЛСА

Сироватковий альбумін людини (ЛСА) є найпоширенішим білком крові, становлячи близько 60% загальної кількості білка з концентрацією 0,6 мМ. Він має негативний заряд (-19) при рН 7,4 та ізоелектричну точку на рівні 5,4. ЛСА складається з 585 амінокислот і трьох структурно подібних, гомологічних  $\alpha$ -спіральных доменів (I, II, III), кожен з яких має десять спіралей, розділених на 6-спіральні та 4-спіральні субдомени (А і В). Цей білок відіграє важливу роль у зв'язуванні органічних і неорганічних молекул, включаючи гідрофобні та аніонні речовини, як ковалентно, так і нековалентно (16).

Сироватковий альбумін людини відіграє ключову роль в організмі, підтримуючи 75-80% осмотичного тиску та забезпечуючи правильний рН крові. Він здатний зв'язувати та транспортувати багато екзо- та ендогенних речовин, таких як ліки, жирні кислоти, вітаміни, метаболіти, барвники, гормони, амінокислоти та іони металів. Ефективність лікарського засобу залежить від його здатності зв'язуватися з білком, і на цей процес впливають різні фактори, зокрема рН сироватки крові, температура, фізико-хімічні властивості ліганду, його афінність до сайтів зв'язування, концентрація білка та наявність інших екзо- та ендогенних речовин (17).

ЛСА характеризується своєю винятковою здатністю зв'язувати широкий спектр гідрофобних молекулярних лігандів, таких як жирні кислоти, білірубін, тироксин, жовчні кислоти та стероїди. Він виконує функцію стабілізатора і транспортера для цих сполук, а також може забезпечувати важливу буферність вільної концентрації. ЛСА також здатний зв'язувати широкий спектр лікарських засобів у двох основних місцях, які частково перекриваються з місцями зв'язування ендогенних лігандів (18)

Крім того, ЛСА є важливим біомаркером для багатьох захворювань, таких як рак, захворювання печінки (наприклад, цироз або гепатит), ревматоїдний артрит, діабет, гіпертонія, захворювання нирок та серцево-судинні захворювання. Зокрема, низька концентрація ЛСА в сироватці крові та високі рівні ЛСА в сечі можуть вказувати на два важливих патологічних стани: альбумінемію та альбумінурію відповідно (16,19). Третинна структура сироваткового альбуміну людини (ЛСА) містить 17 дисульфідних містків, одну вільну тіольну групу з залишку цистеїну (Cys-34), залишок триптофану (Trp-214) та 17 тирозильних залишків (20). ЛСА має серцеподібну конфігурацію, яка утворена трьома гомологічними доменами (рис.1.6): домен I (залишки 1-197), домен II (залишки 189-385)

та домен III (залишки 381-585). Кожен з цих доменів складається з двох субдоменів, позначених як А і В.

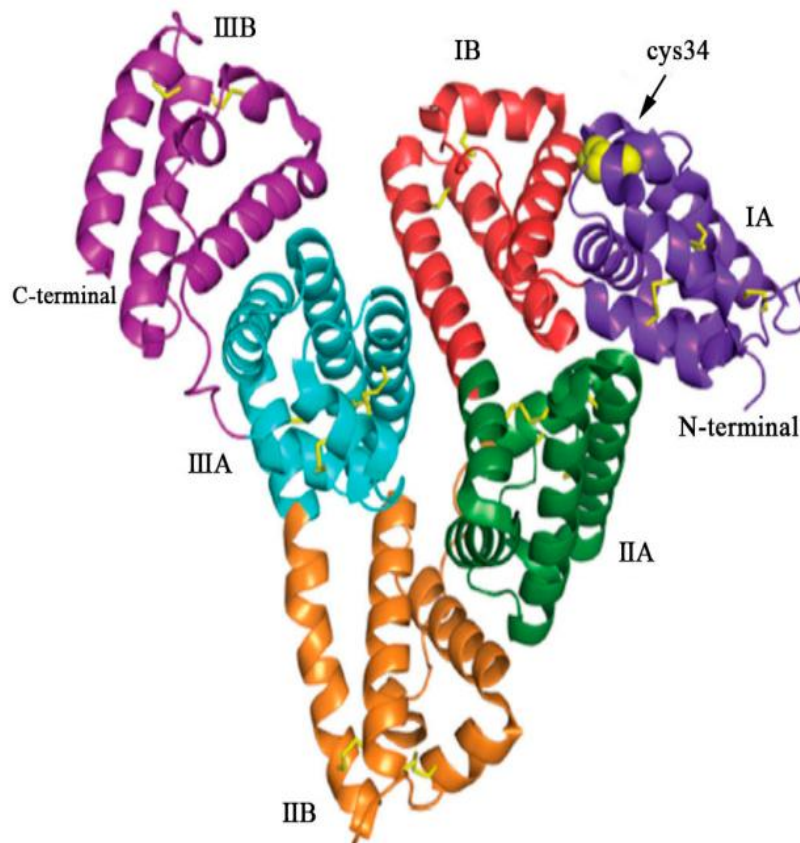


Рис.1.6. Структура ЛСА з позначеними доменами (I, II та III) та піддоменами ( IA (фіолетовий), IB (червоний), IIA (зелений), IIB (помаранчевий), IIIA (синій) і IIIB (фіолетовий)). Жовті палички представляють дисульфідні містки, а жовті кульки - вільний залишок цистеїну, розташований у положенні 34 (Cys34) в домені IA (20)

Амінокислотний залишок триптофану (Trp) часто використовується для дослідження взаємодії альбуміну з ендогенними та екзогенними молекулами за допомогою флуоресцентної спектроскопії. У структурі ЛСА є лише один залишок триптофану (рис.1.7), який знаходиться в субдомені IIA (Trp-214) (21).



Рис.1.7. Триптофановий амінокислотний залишок в структурі людського сироваткового альбуміну (22).

Присутність молекул, що взаємодіють з ЛСА, може впливати на його флуоресценцію (23). Цей ефект залежить від концентрації молекул і середньої відстані між ними та індольним фрагментом хромофора Trp. Зазвичай спостерігається зниження інтенсивності флуоресценції, що свідчить про те, що молекула виступає як гасник флуоресценції (рис.1.8).

Білки зазвичай мають смугу поглинання при 280 нм (рис.1.9) , що відповідає поглинанню УФ-світла трьома типами ароматичних залишків: триптофаном (Trp), фенілаланіном (Phe) і тирозином (Tyr). Серед трьох згаданих ароматичних амінокислот найбільш інтенсивне поглинання і випромінювання має Trp, який має вищу молярну поглинальну здатність і квантовий вихід власної флуоресценції, ніж тирозин і фенілаланін (21).

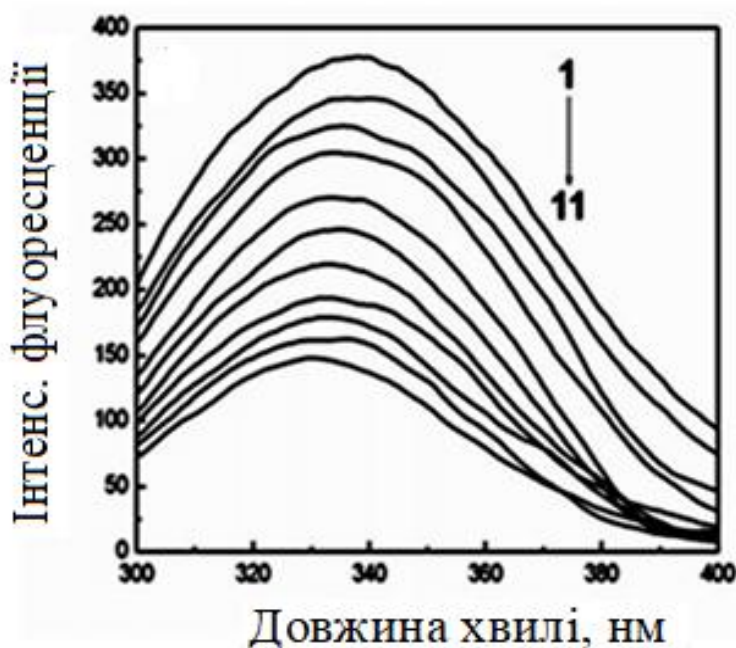


Рис.1.8. Спектри флуоресценції ЛСА за відсутності (1) та в присутності наночастинок срібла (AgNPs) (2-11) різної концентрації ( $C_{\text{ЛСА}}=10^{-6}$  М,  $C_{\text{AgNPs}}=0-1 \cdot 10^{-10}$  М) (24).

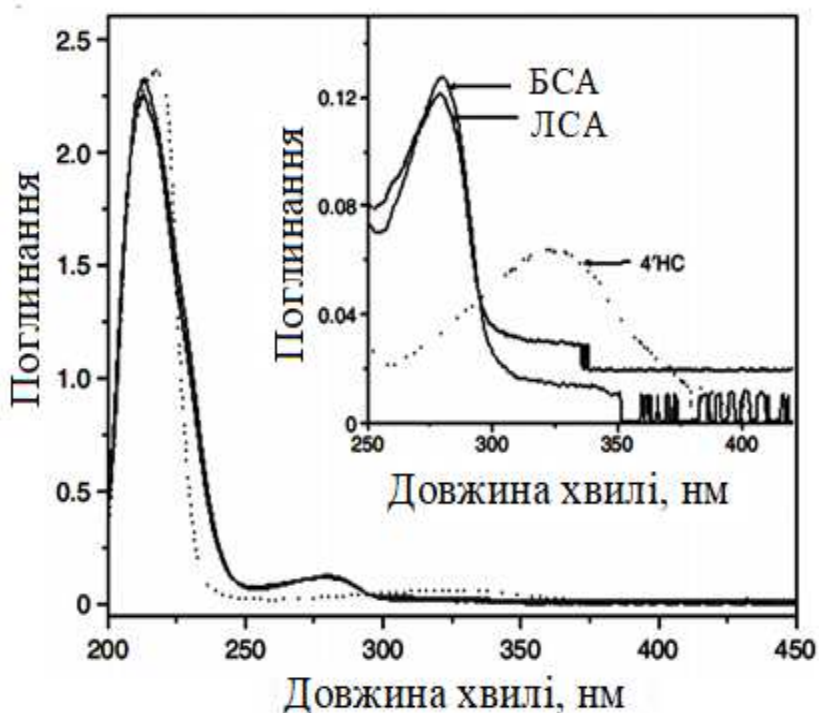


Рис.1.9. Спектр поглинання БСА ( $3 \times 10^{-6}$  Мол/л), ЛСА ( $3 \times 10^{-6}$  Мол/л). Пунктирна лінія представляє спектр поглинання 4'НС ( $2 \times 10^{-6}$  Мол/л). Вставка показує збільшений спектр в діапазоні 250-450 нм (25).

### 1.3. Комплексоутворення БСА та ЛСА з медичними препаратами

Сильні взаємодії між лікарськими засобами та сироватковим альбуміном знижують рівень вільних препаратів у плазмі крові, тоді як слабкі взаємодії можуть призводити до короткого періоду напіввиведення або недостатнього розподілу препаратів в організмі. Тому дослідження зв'язування лікарських засобів із сироватковим альбуміном має важливе значення для фармакології та фармакодинаміки. Зокрема, *in vitro* аналіз цих взаємодій використовується як модель у білковій хімії для вивчення механізмів зв'язування білків (13).

Розуміння механізмів взаємодії між лікарськими засобами та сироватковим альбуміном має ключове значення для вивчення фармакокінетики та фармакодинаміки препаратів. Зокрема, зв'язок лікарських засобів з альбуміном визначає їх біодоступність: зв'язана фракція діє як резервуар, тоді як вільна фракція проявляє фармакологічну активність. У випадках, коли рівень зв'язування з білками недостатній, препарати можуть метаболізуватися та виводитися з організму занадто швидко, не встигаючи забезпечити належний терапевтичний ефект. Навпаки, високе зв'язування з білками може уповільнювати метаболізм і виведення, що подовжує період напіввиведення та підвищує ризик побічних ефектів.

Надмірно висока афінність до сироваткового альбуміну може також обмежувати доступність препаратів у тканинах-мішенях, що знижує їхню ефективність. Таким чином, абсорбція, розподіл, метаболізм і виведення препаратів значною мірою залежать від їхнього зв'язування з альбуміном. Дослідження також виявили, що взаємодія лікарських засобів із сироватковим альбуміном може викликати конформаційні зміни цього білка, впливаючи на його функцію як переносника(26). Отже, аналіз цих

взаємодій має вирішальне значення для розробки ефективних і безпечних препаратів (27).

Наявність двох сайтів зв'язування в ЛСА та БСА приводить до створення комплексів з різноманітними лікарським препаратами, що сприяє пролонгації циркуляції цих засобів потоці крові без їх пошкодження, що підвищує біодоступність ліків (23,28), в тому числі з флавоноїдами (29).

Дослідження чотирьох широко використовуваних цефалоспоринів (цефалексин, цефаклор, цефіксим і цефепім) і порівняння їхньої взаємодії з ЛСА, зокрема спектральні дані поглинання показали, що різні бічні ланцюги R1-групи та кон'югована структура змінюють абсорбцію ЛСА. Експерименти з визначення інтенсивності флуоресценції показали, що хлор послаблює полярність мікрооточення навколо флуорофорних груп ЛСА і посилює його гідрофобність (30).

Дослідження взаємодії ібупрофену з людським сироватковим альбуміном показало, що жирні кислоти та температура впливають на зв'язування ліків з білком. Зокрема, підвищення температури сприяє утворенню більш стабільних комплексів, що знижує терапевтичний ефект, а жирні кислоти в молекулі альбуміну підвищують ефективність ліків. Ібупрофен зв'язується з альбуміном через тирозинові залишки, і його вивільнення з комплексу сповільнюється в присутності жирних кислот, що забезпечує триваліший, але менш інтенсивний ефект. Результати також вказують на важливість гідрофобних взаємодій у зв'язуванні (31).

Дослідження взаємодії між рофлуміластом (РОФ) - препаратом, що застосовується для лікування хронічної обструктивної хвороби легень, бляшкового псоріазу, себореїного дерматиту та атопічного дерматиту, та бичачим сироватковим альбуміном на молекулярному рівні за допомогою різних методів (32) показало, що РОФ гасить флуоресценцію БСА, утворивши комплекс, який зв'язувався з піддоменом ІА (сайт І) БСА,

спричиняючи конформаційні зміни. Процес зв'язування було зумовлено гідрофобними силами, що підтверджується позитивними значеннями ентальпії та ентропії. Дані спектроскопії УФ–видимого та синхронізованої флуоресценції показали, що взаємодія між РОФ та БСА викликала зміни в конформації останнього.

Наночастинки, зокрема радіоактивні наночастинки золота, що покриті бичачим сироватковим альбуміном (БСА) мають високу стабільність та якість та мають важливий потенціал для онкологічного лікування. Цитотоксичні дослідження на клітинах раку простати показали позитивні результати, хоча необхідно поліпшити селективність для зменшення побічних ефектів на здорові клітини (33). Біорозподіл і терапевтична ефективність на мишах виявили значний потенціал  $^{198}\text{AuNPs}$  БСА у боротьбі з пухлинами, зокрема, при регресії пухлин. Гематологічні дослідження показали, що ці наночастинки мають хороший профіль безпеки, принаймні щодо гематологічної системи. Загалом,  $^{198}\text{AuNPs}$  БСА мають обнадійливі результати для лікування раку простати, але потребують подальших досліджень для покращення ефективності та мінімізації побічних ефектів.

Дослідження комплексів ЛСА із детермінантами пеніциліну G є важливим для розуміння механізмів алергії на антибіотики (34). Виявлено, що зв'язування детермінант пеніциліну G з ЛСА відбувається за участю субдоменів ІА, ІВ та частково ІІА, причому основну роль відіграють водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії. Ідентифікація сайтів зв'язування може сприяти створенню нових імуногенних антигенів для запобігання алергічним реакціям.

## 1.4. Властивості антиоксидантних наночастинок діоксида церію $\text{CeO}_2$

Наночастинки діоксида церію  $\text{CeO}_2$  характеризуються антиоксидантними, протипухлинними, антибактеріальними та протизапальними властивостями (35–39). Важливим як для потенційного терапевтичного агента є низька токсичність наночастинок  $\text{CeO}_2$ , особливо розмірами до 6 нм (40). Крім того, завдяки конверсії між станами  $\text{Ce}^{3+}$  та  $\text{Ce}^{4+}$  наноцерій здатен повторно брати участь в окислювально-відновних процесах в клітині (41–43). Біомедичне застосування наночастинок  $\text{CeO}_2$  включає радіотерапію ракових захворювань, редокс- та хіміотерапії (44,45).

Церій може перебувати у двох ступенях окислення —  $\text{Ce}^{3+}$  і  $\text{Ce}^{4+}$ . Він легко реагує з киснем, утворюючи два стабільних оксиди ( $\text{CeO}_2$  і  $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ), а також кілька проміжних сполук і фаз зі змінним складом. Діоксид церію характеризується кубічною гранецентрованою кристалічною решіткою (рис.1.10) (структурний тип флуориту) з параметром елементарної комірки  $a = 5.411 \text{ \AA}$ , у якій кожен атом церію зв'язаний із вісьмома атомами кисню (46).

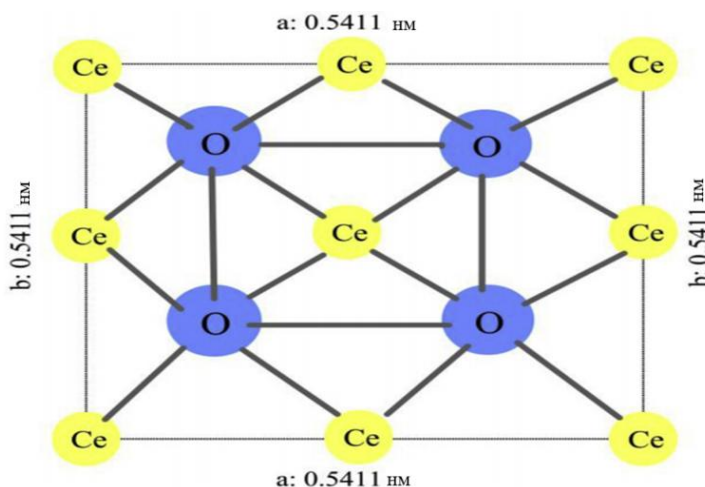


Рис.1.10. Кубічна структура діоксида церію ( $\text{CeO}_2$ ) з позначеними атомами [40].

Наночастинки оксиду церію (наноцерій) мають відому здатність знешкоджувати активні форми кисню (АФК), виконуючи роль деяких оксидоредуктаз, таких як каталаза, супероксиддисмутаза та оксидаза, а також фосфатаз. НОЦ здатні захищати органічні барвники та клітинні тканини від ультрафіолетового випромінювання і сприяють синергічному підвищенню захисної активності від УФ-випромінювання, яку забезпечує D-пантенол.

Нанопорошки  $\text{CeO}_2$  синтезуються різними методами, серед яких гідротермальний, механохімічний, сонохімічний, метод синтезу через горіння, золь-гель, реактор з напівзарядним періодом, мікроемульсія та піроліз з розпиленням (47).

Крива поглинання чистого зразка  $\text{CeO}_2$  складається з однієї великої смуги з максимумом близько 270 нм (рис.1.11) (48). Чистий  $\text{CeO}_2$  демонструє сильне поглинання у діапазоні УФ (нижче 400 нм) через переходи заряду з O 2p до Ce 4f, які перекривають добре відомий поділ f-f стану Ce 4f.

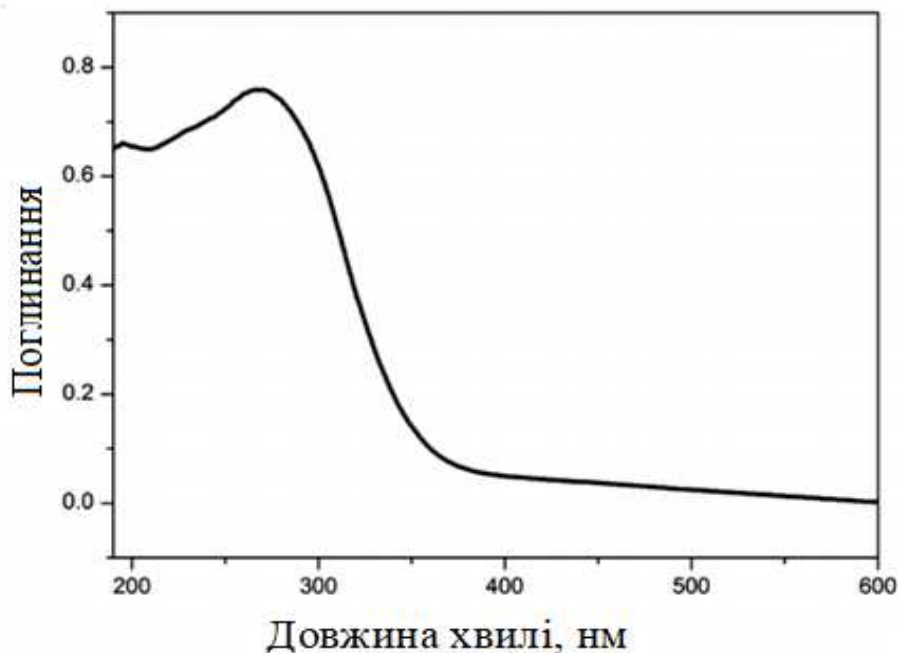


Рис.1.11. Спектр оптичного поглинання в УФ-діапазоні наночастинок чистого  $\text{CeO}_2$  [42].

Спектри фотолюмінесценції при кімнатній температурі для трьох зразків оксиду церію, синтезованих за різних значень рН показано на рис.1.12 (49). Отже, при високій концентрації станів  $Ce^{3+}$  і високій концентрації вакансій кисню великий відсоток валентних електронів може бути збуджений і перебувати в станах, які генерують дефекти в забороненій зоні, або, якщо ці дефекти мають електрони (іонізовані стани), вони можуть перейти в зону провідності, що призведе до реєстрації високого емісійного сигналу (рис.1.12 а-в)

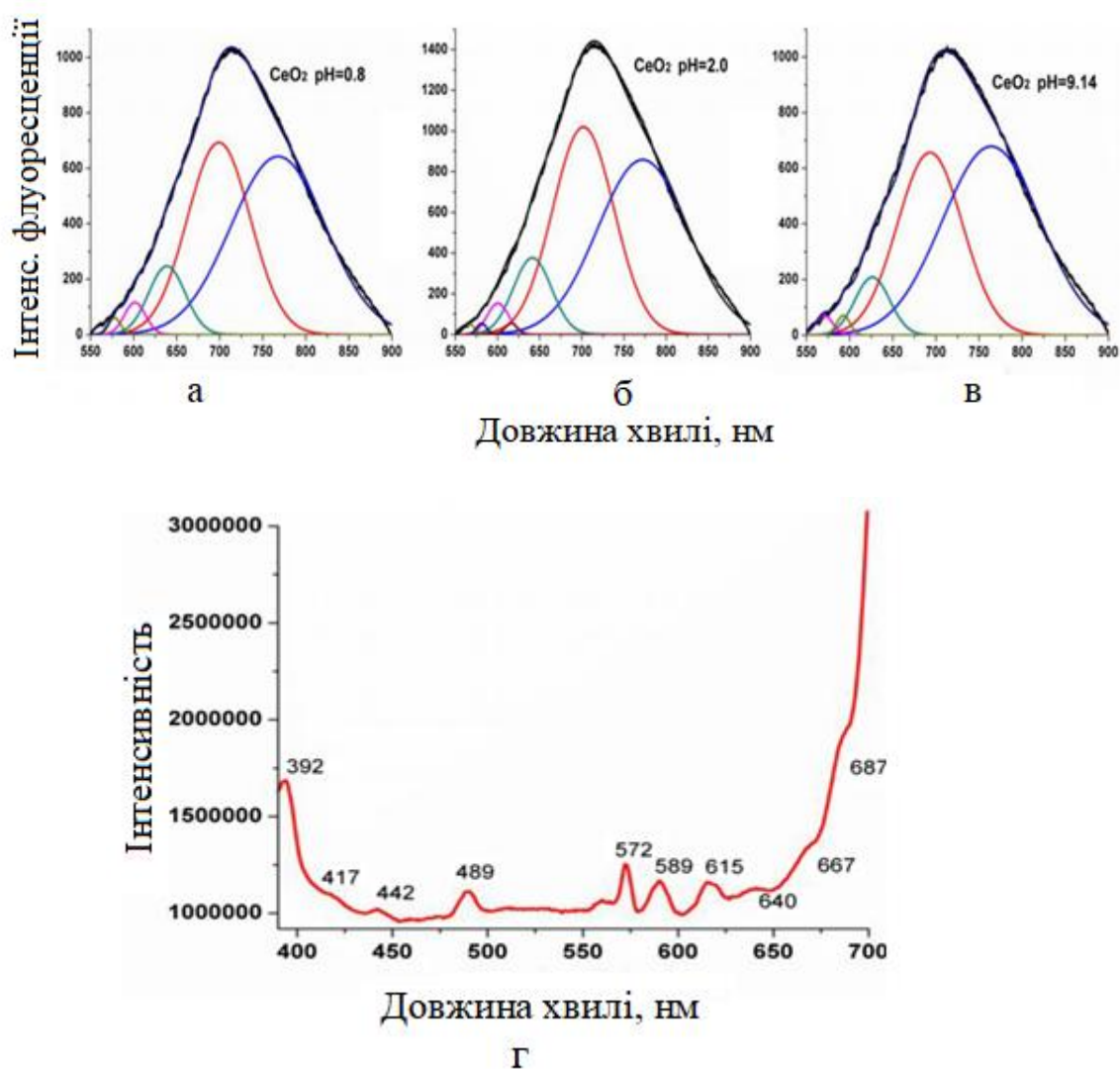


Рис.1.12. Спектри фотолюмінесценції  $CeO_2$ , синтезованого при рН  $\sim 1$  (а), рН  $\sim 2$  (б), рН 9.14 (в) з використанням аргонного лазера (488 нм); спектр фотолюмінесценції зразка церію, синтезованого при рН  $\sim 2$  (г), з використанням ксенонового лазера (360 нм) [43].

Спектри складаються, в основному, з п'яти смуг випромінювання: при 575 нм, 600 нм, 635 нм, 698 нм та 768 нм. Спектр фотолюмінесценції зразка, синтезованого при рН  $\sim 2$  (рис.1.12 г), був записаний за допомогою ксенонового лазера з довжиною хвилі 360 нм для кращого розуміння оптичної поведінки синтезованих наночастинок  $\text{CeO}_2$  і доповнення попередніх результатів фотолюмінесценції, враховуючи переходи між зонами. Цей спектр демонструє одну смугу випромінювання в УФ-діапазоні — 391 нм, а також у видимому діапазоні: 417 нм, 442 нм, 489 нм, 572 нм та 589 нм.

### **1.5. Властивості антиоксидантних лікарських препаратів куркуміну та кверцетину**

Флавоноїди — це клас природних фенолів, які мають важливу фармакологічну активність і були предметом досліджень протягом тривалого часу. Одним із основних флавоноїдів, що міститься в харчовому раціоні людини, є кверцетин (3,5,7,30-40-пентагідроксифлавонол), який в основному зустрічається у вигляді глікозиду (кверцетин-3-глюкозид) в їжі. Численні дослідження демонструють його фармакологічні властивості (50), такі як антиоксидантна активність (51,52), протизапальні властивості, протипухлинні (53), а також антипроліферативні і антиангіогенні ефекти, вплив на старіння, захист печінки та нирок (54,55).

Попри ці корисні властивості, кверцетин у своєму базовому вигляді має низьку розчинність у воді і погану біодоступність, зумовленої деградацією в присутності молекул води, що ускладнює його ефективне всмоктування при пероральному застосуванні, обмежуючи його використання в клініці або як частину харчових добавок. У зв'язку з цим, нанотехнології можуть запропонувати ефективне вирішення цієї проблеми, оскільки вони забезпечують численні інноваційні підходи, такі

як створення кон'югатів з антитілами, використання носіїв для доставки лікарських засобів, забезпечення захисту від ультрафіолетового випромінювання, антимікробні властивості та багато інших застосувань (56–60).

Підвищення фармакінетичної ефективності та біодоступності кверцетину досягається різними шляхами, в тому числі за рахунок утворення кон'югатів з наночастинками (60), комплексів з іонами металів (61–63), амінокислот (64). Особливе місце збереження структури гідрофобних флавоноїдів, в тому числі кверцетину, куркуміну та інших недостатньо біодоступних молекул відіграють методи інкапсулювання цих медичних препаратів в ядрах міцел плуроніка (65) та при застосуванні полімерних наночастинок, покритих шаром плуроніка (66).

До будови кверцетину входять два ароматичні кільця А і В, об'єднані між собою пірановим циклом (67). В цій молекулі можна виділити кілька важливих структурних елементів, що виступають активними центрами. До них можна віднести подвійний зв'язок між атомами карбону 2 і 3, спільно з карбонільною групою  $C=O$  з атомом  $C$  в положенні 4, які сприяють де локалізації від кільця В. Крім того, мають місце дві гідроксильні групи  $OH$  в положеннях 3 і 5 спільно з карбонільною групою, а також дві гідроксильні групи в положеннях 3' і 4' (рис.1.7).

Кверцетин проявляє антирадикальну активність по відношенню до різного типу вільних радикалів кисню, що накопичується в організмі за рахунок передачі їм електронів або атома гідрогену. За антирадикальну активність цього препарату відповідає дисоціація гідроксильної групи фенолу, яка переходить в свою чергу аніону форму в залежності від величини рН середовища. З ростом рН антирадикальна активність кверцетину підвищується. Таким чином, наявність в структурі кверцетину трьох активних центрів, як відмічалось, супроводжується можливістю взаємодії з білками за рахунок гідрофобних, електростатичних і водневих

зв'язків, наявність яких передбачає кількість сайтів зв'язування. Крім того, молекула кверцетину може перебувати в кількох s-цис і s-транс ізоморфних формах.

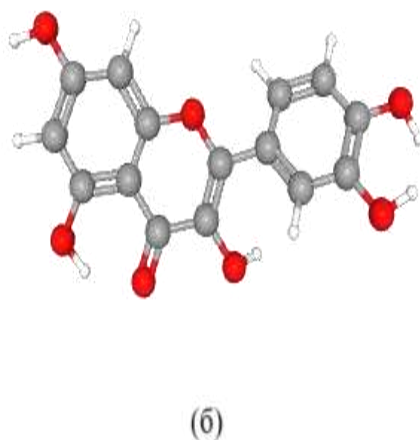
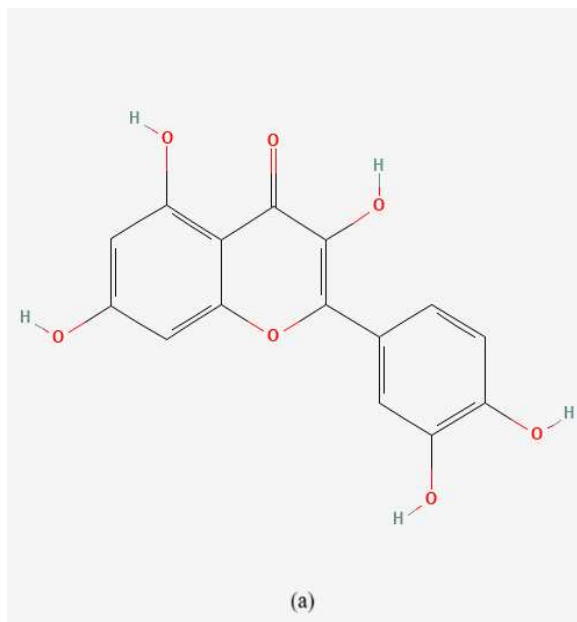


Рис.1.6. Хімічна будова 2D (а) (68) та 3D конформер кверцетину (б) (69).

В зв'язку з цим він знаходить застосування у цілому ряді терапевтичних практик: протипухлинній, лікуванні легневих хвороб, діабету, серцево-судинних захворювань тощо.

Флавоноїди виявляють дві основні смуги поглинання, які позначаються як смуга I (300–400 нм) і смуга II (240–280 нм) в УФ-видимих вимірюваннях. Смуга I відповідає поглинанню через циннамоїльною систему, яка

утворюється між двома кільцями у структурі флавоноїду. Смуга II виникає після поглинання бензоїльної групи, також утвореної двома кільцями. УФ-видимі спектри чистого кверцетину показують дві смуги поглинання 355 нм (смуга I) та 253 нм (смуга II), що відповідає даним літератури (70). При поступовому додаванні спиртів до розчинів спостерігається червоний зсув смуги I і поступове зменшення поглинання розчинів, що вказує на те, що досліджувані спирти можуть безперервно діяти як гасники (71).

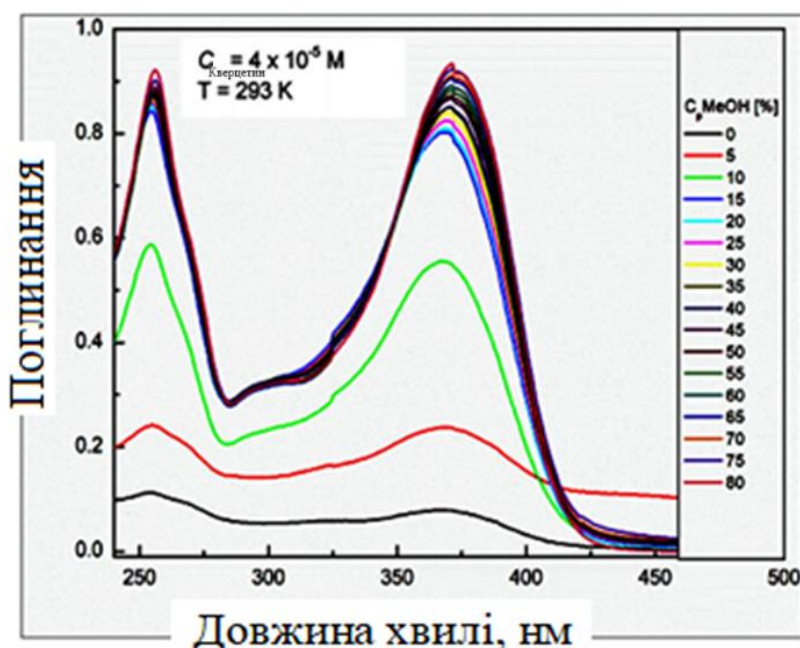


Рис.1.7. Спектри поглинання кверцетину ( $C_{\text{Кверцетин}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) з різною концентрацією MeOH при  $T = 293 \text{ K}$  (71).

В спектрах поглинання етанольного розчину кверцетина є смуги поглинання з високими значеннями молярних коефіцієнтів поглинання, що вказує на ефективне поглинання ними світлової енергії. Спектр флуоресценції кверцетину характеризується один піком при 500–550 нм при збудженні хвилі близько 370-380 нм (рис.1.8) (72).

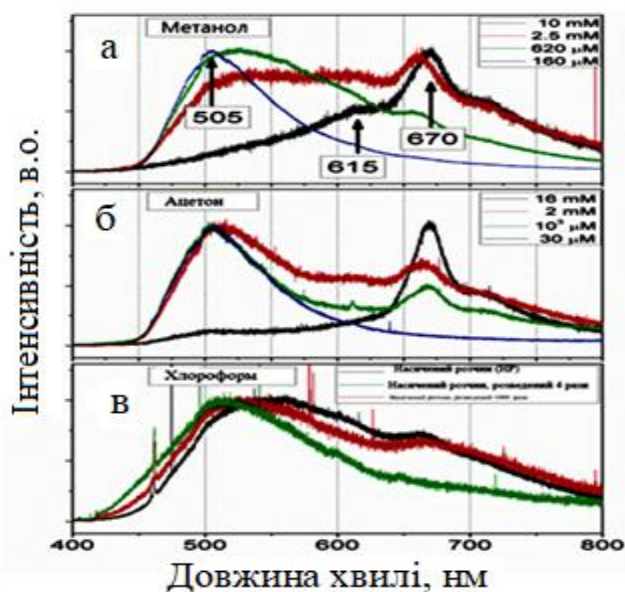


Рис.1.8. Спектри випромінювання ФЛ, виміряні при кімнатній температурі для кверцетину в: (а) метанолі, (б) ацетоні та (в) хлороформі, з різними концентраціями [63].

Куркумін є антиоксидантним препаратом, що належить до сімейства імбирних (*Zingiberaceal*) і широко використовується в медицині (73). Він застосовується для лікування інфекцій, стресу, депресії та дерматологічних захворювань (74–76). Дослідження показали, що куркумін є ефективним при запаленнях, метаболічному синдромі, болях, а також при лікуванні дегенеративних захворювань очей. Попри численні терапевтичні переваги, більшість із них обумовлені його антиоксидантною та протизапальною активністю. Однак основною проблемою при прийомі куркуміну є його низька біодоступність, що зумовлена поганим всмоктуванням, швидким метаболізмом і виведенням. Це створює необхідність розробки методів ефективної доставки куркуміну до уражених клітин організму (77–86).

Куркумін є ліпофільною фенольною структурою, практично нерозчинним у воді (87–89). При цьому перебування куркуміну у воді приводить до поступової деградації даного препарату. З цієї причини важливим є використання захисних структур, здатних розміщувати згадані ліки

в гідрофобному середовищі (90,91). Куркумін є багатofункціональними антиоксидантом з різноманітними групами. Антиоксидантні властивості реалізуються за рахунок фенольних гідроксильних та метоксильних груп, дикетону та подвійних зв'язків (74,92,93). Крім того в-кето-енольний таутомер Куркумін має потрібні місця хелатування металів, що дозволяють утворювати хелати з іонами окисно-відновлювальних металів  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  та інші (74,92).

Молекула куркуміну ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ ) складається з двох ароматичних кілець, з'єднаних метиленовим містком (рис.1.9). Вона містить дві кетогрупи, фенольні гідроксильні групи та подвійні зв'язки, що забезпечують антиоксидантну активність. Куркумін проявляє таутомерію між кето- та енольними формами. Молярна маса куркуміну дорівнює 368,37 г/Моль.

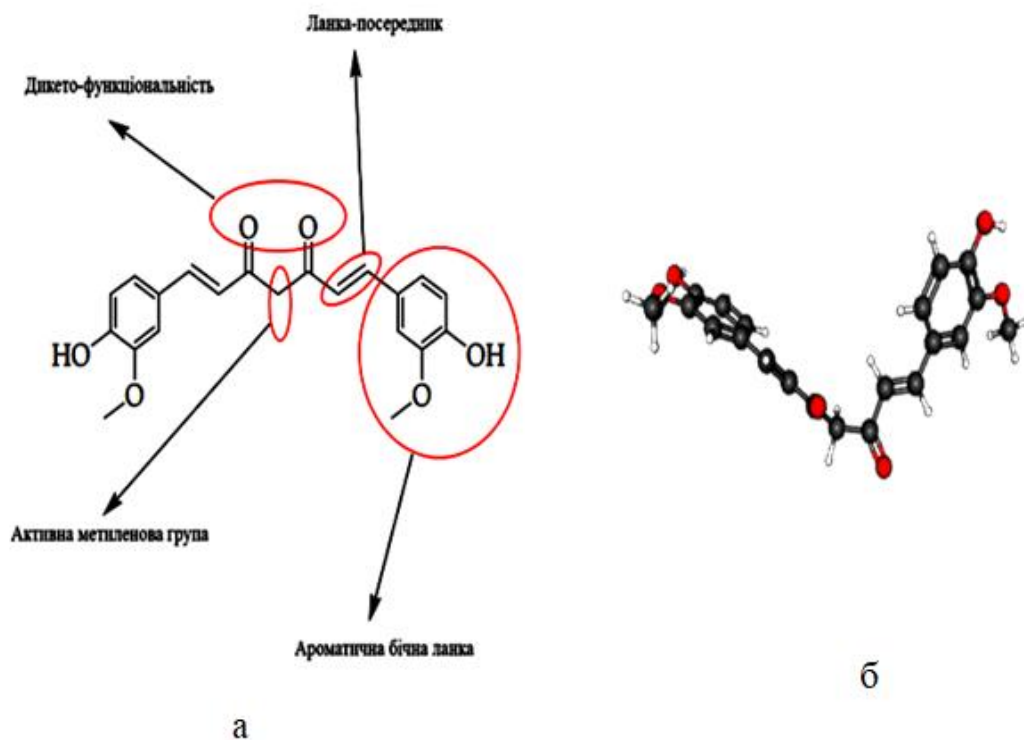


Рис.1.9. Структура куркуміну з вказаним основним реактивним центром (а) (94) та 3D конформер куркуміну (б) (95).

Куркумін добре розчиняється в полярних розчинниках, таких як метанол, етанол, хлороформ, етилацетат та інші, і має помірну розчинність у вуглеводневих розчинниках, таких як циклогексан та гексан (96). Пік оптичного поглинання куркуміну залежить від середовища та спостерігається в двох основних областях. У розчинах 2-бутанолу, хлороформу, етилацетату та ксилену пік розташований в області 416 - 421 нм, тоді як у ДМСО пік з'являється при 437 нм (рис.10) (97). Максимум поглинання куркуміну та його похідних зміщується до коротших хвиль, коли розчинник змінюється з більш полярного на неполярний.

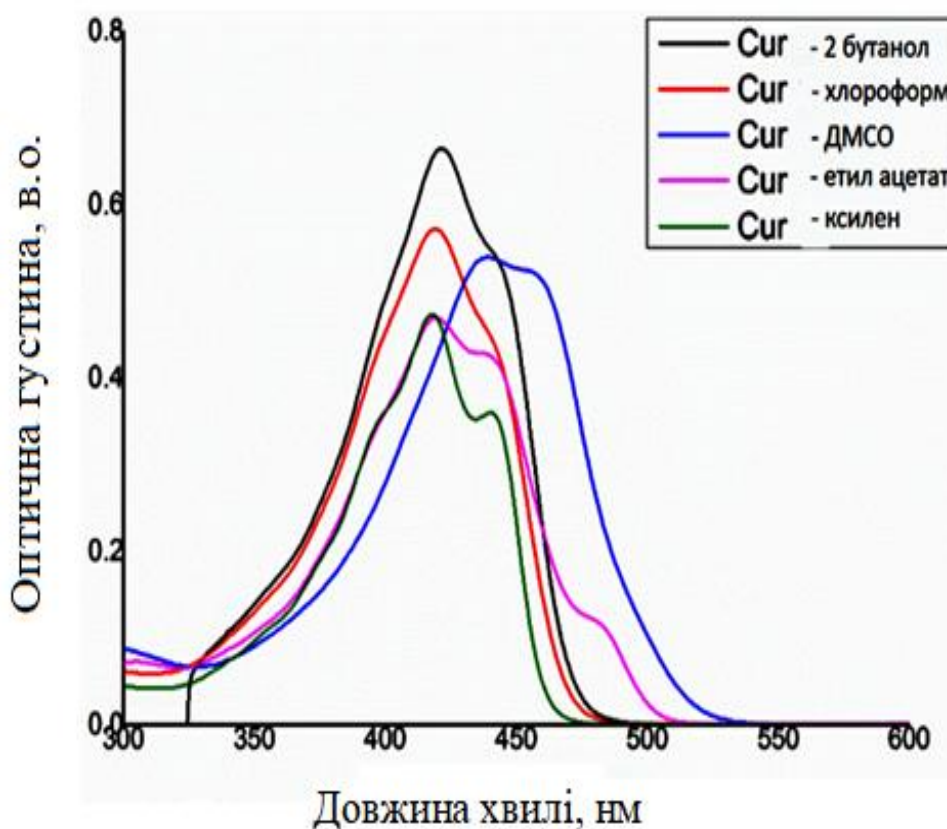


Рис.1.10. Спектри поглинання куркуміну в різних розчинниках [85].

Куркумін має флуоресцентні властивості, при цьому інтенсивність спектрів емісії залежить від розчинника. При збудженні хвилею з  $\lambda_{36} = 440$  нм пік спостерігається близько 550-565 нм (рис.1.11) (98).

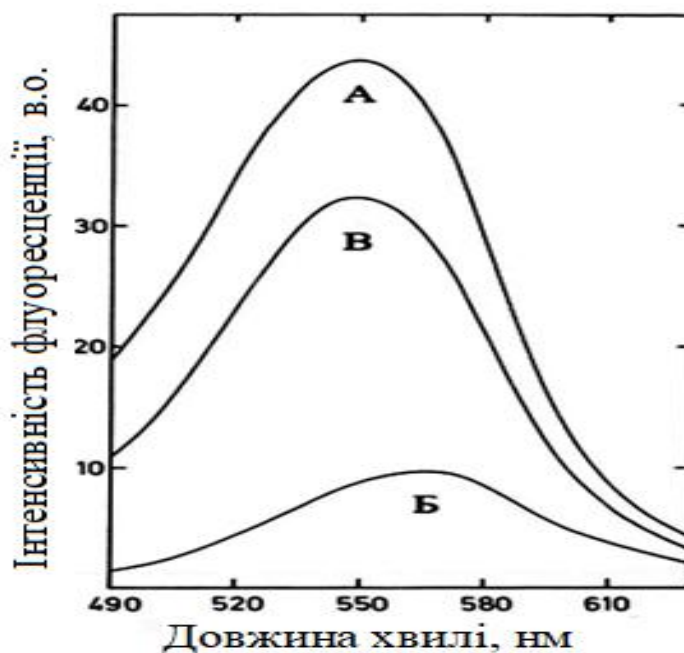


Рис.1.11. Спектри емісії флуоресценції розчинів куркуміну ( $1.36 \times 10^{-5}$  мМ) у дистильованій воді (А), 10 мМ НСІ (Б) та 10 мМ NaOH (В) ( $\lambda_{36} = 440$  нм) [86].

Саме тому, куркумін та кверцетин завдяки своїм фізико-хімічним властивостям та широкому спектру застосування в медицині та фармакології є перспективними об'єктами досліджень, особливо в спектроскопії.

### **1.6. Комп'ютерне моделювання комплексів протеїнів з медичними препаратами та наночастинками**

Природа взаємодії між лікарськими засобами та білками відкриває нові можливості для розробки інноваційних препаратів, що має важливе значення для їхнього розподілу в тканинах і швидкості метаболізму (99). Дія лікарського засобу залежить від наявності його вільної форми в плазмі крові, яка може взаємодіяти з рецепторними ділянками та спричиняти фармакологічний ефект. Дослідження підтверджують, що препарати

можуть циркулювати в крові як у вільному стані, так і у формі комплексів із білками плазми. Таким чином, зв'язування ліків із білками плазми є важливим чинником, що визначає їхню фармакокінетику та фармакодинаміку (100).

Молекулярний докінг є одним із найпоширеніших і найпотужніших методів, що застосовуються у процесі розробки лікарських засобів. Цей підхід дозволяє змоделювати взаємодію між малою молекулою та білком на атомному рівні, що забезпечує можливість аналізувати функції малих молекул у зв'язувальних ділянках білків-мішеней та пояснювати ключові біохімічні процеси. Основна мета молекулярного докінгу полягає у прогнозуванні зв'язування та взаємодії між різними молекулами (101).

На сьогодні існує багато програм для молекулярного докінгу, таких як Autodock, Autodock Vina та Molergo, які використовують різні алгоритми для моделювання цих взаємодій. Завдяки молекулярному докінгу можна оцінити потенціал зв'язування між молекулами та білками без потреби в складних або дорогих лабораторних експериментах.

Моделювання взаємодії протипухлинного препарату цитабіну та людського сироваткового альбуміну (102) показало, що вони утворюють стабільний комплекс, створюючи водневі зв'язки та підтримуючи оптимальну відстань один від одного. Стабільність цього комплексу зберігається до кінця моделювання при температурі тіла (310 K). Результати свідчать, що людський сироватковий альбумін є ефективним варіантом для транспортування цитарабіну до ракових клітин. Однак при температурі 313 K комплекс ЛСА-цитарабін стає нестабільним через розкриття білка та зменшення кількості водневих зв'язків, що призводить до зміни відстані між препаратом і білком. Це дозволяє зробити висновок, що препарат вивільняється при температурі, характерній для ракових пухлин (313 K).

Для більш глибокого розуміння фармакологічних і біохімічних аспектів взаємодії нератинібу, затвердженого для лікування ранніх стадій HER2 позитивного/ампліфікованого раку молочної залози, було досліджено його взаємодія з БСА (103). Експерименти з використанням молекулярного докінгу для визначення сайту зв'язування показали, що нератиніб зв'язується з сайтом I, піддоменом ІА БСА. Результати флуоресцентного гасіння, синхронної флуоресценції, УФ-спектроскопії та Раманівської та ІЧ-спектроскопії підтвердили утворення комплексу між БСА та нератинібом. Взаємодія між БСА і нератинібом здійснювалася за рахунок сил Ван-дер-Ваальса та водневих зв'язків і була керована ентальпійними процесами.

Дослідження флоридзину, що має антиоксидантні, протизапальні та протидіабетичні властивості, з білком (104) показало, що зв'язується з ЛСА відбувається переважно через гідрофобні взаємодії та водневі зв'язки, що призводить до часткового розгортання білка. Також було детально проаналізовано механізм взаємодії флоридзину з білком та вплив утворення комплексу флоридзин–ЛСА на стабільність і вторинну структуру білка. У результаті взаємодії спостерігалось розгортання білка із помітним зменшенням вмісту  $\alpha$ -спіралі. Молекулярний докінг та експерименти з витісненням лігандів підтвердили, що основне місце зв'язування флоридзину розташоване поблизу сайту I на ЛСА. Ці результати є важливими для розуміння фармацевтичного потенціалу флоридзину у лікуванні різних захворювань. Дослідження взаємодії нітрофурантоїну (антибактеріального препарату) з сироватковим альбуміном людини показали, що нітрофурантоїн зв'язується в гідрофобній кишені субдомену ІА білка (рис.1.12) (105). Взаємодія включає водневі зв'язки, гідрофобні, іонні та полярні взаємодії. Нітрофурантоїн утворює водневі зв'язки з Trp214, Arg218 і Ser454.

Ці висновки сприяють кращому розумінню фармакокінетики нітрофурантоїну та допомагають у розробці нових аналогів з покращеним біологічним потенціалом.

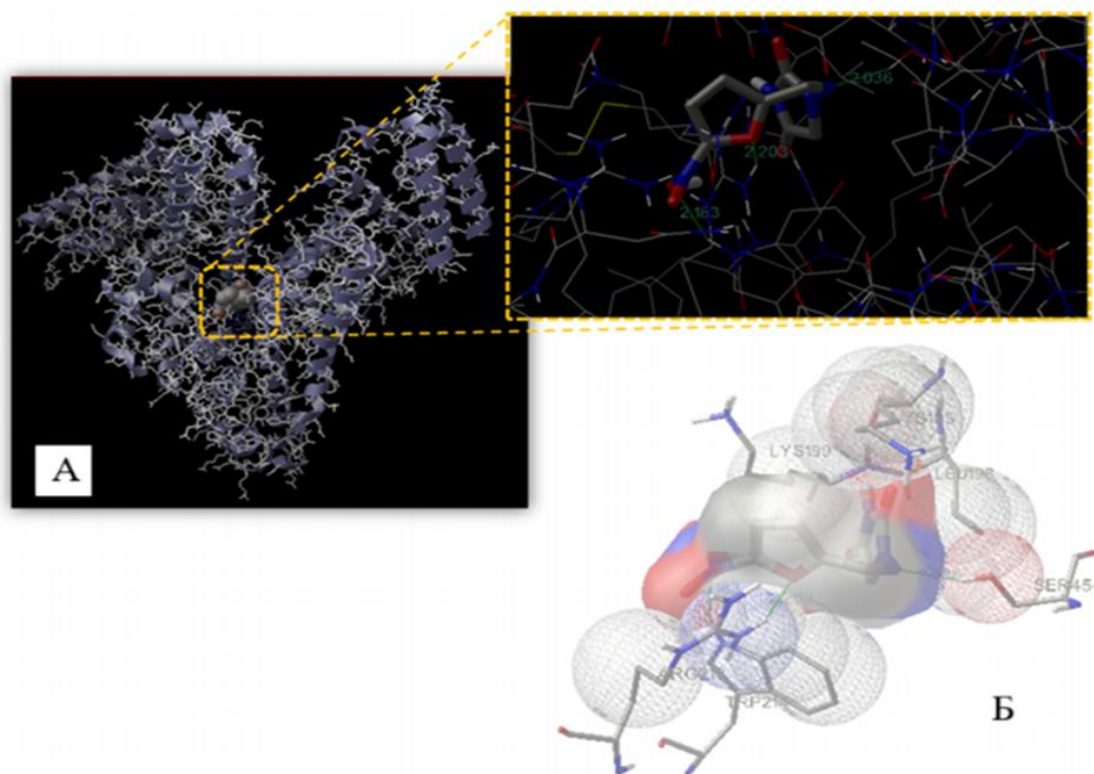


Рис.1.12. Місце зв'язування нітрофурантоїну з ЛСА. Структура ЛСА зображена у вигляді стрічок і ліній, тоді як нітрофурантоїн показаний у вигляді заповненої моделі. Вставка демонструє збільшене зображення місця зв'язування, де нітрофурантоїн представлений у вигляді моделі паличок. Водневі зв'язки між лігандом і білком позначені зеленим кольором, відстань виражена в ангстремах (Å) (А). Зображення амінокислотних залишків у місці зв'язування з урахуванням їхніх радіусів Ван дер Ваальса (Б) (105)

Дослідження взаємодії флавоноїдів катехіну та епікатехіну з білками БСА та ЛСА (99) показали, що обидва флавоноїди міцно зв'язуються з ними, маючи константи зв'язування в межах  $10^3$ - $10^5$  на одному сайті.

Катехін та епікатехін, стереоізомери, що відрізняються за конфігурацією у 2-му та 3-му положеннях бензопіранової частини, взаємодіють по-різному з амінокислотними залишками білка, як показано у докінгових дослідженнях.

В Розділі 1 наведено основні відомості про протеїни, їх будову, оптичні властивості та комп'ютерне моделювання протеїнів з медичними препаратами.

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

#### 2.1. Матеріали та приготування розчинів

Для приготування розчинів БСА з кверцетином використовувався бичачий сироватковий альбумін (БСА) ( $\geq 98\%$ ) виробництва Sigma, США та кверцетин ( $\geq 99,77\%$ ) виробництва ПАТ НДЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна. Розчини готували у водному розчині ( $\text{pH} = 5,5$ ) з ДМСО виробництва Sigma, США.

Для зразків БСА з наночастинками діоксиду церію використовувався бичачий сироватковий альбумін фракції V виробництва PAA, Австрія. Цитрат-стабілізовані наночастинки діоксиду церію розміром 3-4 нм були отримані в Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України. Розчини готувались в фізіологічному розчині (0,9% NaCl) виробництва Юрія-Фарм,  $\text{pH}=5,5$ .

Для системи БСА – куркумін порошкоподібні речовини, а саме бичачий сироватковий альбумін (БСА) ( $\geq 98\%$ ) виробництва Sigma, США, куркумін ( $\geq 99,77\%$ ) виробництва ПАТ НДЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна та кверцетин ( $\geq 99,77\%$ ) виробництва ПАТ НДЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна, використовувались для водних зразків. Речовини розчиняли у воді ( $\text{pH} = 5,5$ ) з ДМСО виробництва Sigma, США. Диметилсульфоксид (ДМСО) додавався пропорційно концентрації куркуміну в розчинах через низьку розчинність антиоксиданту у воді [93]. Розчини готувались в об'ємах 1.5 мл перед експериментом. Концентрація БСА залишалась сталою для всіх зразків ( $C_{\text{БСА}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) БСА-куркумін, проте концентрація куркуміну була змінною ( $C_{\text{Куркумін}} = 0, 2.5, 5, 7.5 \cdot 10^{-7}, 1, 2, 3, 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).

Водні розчини ЛСА з кверцетином з додаванням DMSO виробництва Sigma, США (з причини низькою розчинності флаваноїда) готувались з людським сироватковим альбуміном (ЛСА) ( $\geq 98\%$ ) виробництва Sigma, США та кверцетин ( $\geq 99,77\%$ ) виробництва ПАТ НДЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна зі сталим рН (5.5). Розчини високою концентрації розводились перед експериментом до необхідних концентрацій кверцетину в системі ( $C_{\text{кверцетин}} = 0, 2.5 \cdot 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 7.5 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 1.5 \cdot 10^{-6}, 2 \cdot 10^{-6}, 3 \cdot 10^{-6}, 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ), відсоток ДМСО в розчинах пропорційний концентрації кверцетину, а концентрація альбуміну була сталою для всіх зразків ( $C_{\text{ЛСА}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).

Сироватковий альбумін людини (ЛСА) ( $\geq 98\%$ ) виробництва Sigma, США та куркумін ( $\geq 99,77\%$ ) виробництва ПАТ НДЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна. Розчини готували у водному розчині (рН =5,5) з ДМСО виробництва Sigma, США. Концентрація ЛСА залишалася постійною ( $C_{\text{ЛСА}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ), а концентрація куркуміну змінювалася:  $C_{\text{Куркумін}} = 0, 2.5 \cdot 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 7.5 \cdot 10^{-7}, 1 \cdot 10^{-6}, 1.5 \cdot 10^{-6}, 2 \cdot 10^{-6}, 3 \cdot 10^{-6}, 4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ .

## 2.2 Методи спектральних досліджень розчинів

### 2.2.1. Оптичне поглинання

За допомогою спектроскопії поглинання можна проаналізувати, як речовина поглинає електромагнітне випромінювання. При проходженні електромагнітних хвиль через матеріал їх інтенсивність зменшується, оскільки атоми або молекули переходять з низьких енергетичних рівнів на вищі. Ці переходи можуть супроводжуватися зворотними безвипромінювальними процесами, під час яких енергія збудження передається в інші форми енергії. Існує також процес поглинання, при якому молекула переходить на проміжний рівень без випромінювання, а

потім випромінює світло з більшою довжиною хвилі. Для отримання спектрів використовуються такі інструменти, як спектрометри, спектрофотометри, інтерферометри, що вибираються залежно від діапазону вимірювання. Спектроскопія поглинання широко застосовується для визначення структури, ідентифікації та кількісного аналізу речовин.

Спектри оптичного поглинання БСА були отримані на спектрофотометрі Double Beam Scanning Ultra violet Visible Spectrophotometer Medical Analysis UV-1800APC. Для отримання спектрів оптичного поглинання ЛСА з кверцетином UV-1900 UV/VIS виробництва Масу (Шанхай, Китай), рис. 2.1.



Рис. 2.1. Двопроменевий скануючий спектрофотометр UV-1900 UV/VIS (Масу, Шанхай, Китай) (106).

Характеристики спектрофотометра включають рівень розсіяного світла, який дозволяє значно розширити діапазон лінійності. Скануючий спектрофотометр з ультрависокою швидкістю 29000 нм/хв забезпечує

швидкі виміри, що є важливим для дослідження кінетичних характеристик процесів і хімічних реакцій.

### 2.2.2. Флуоресценція гасіння та збудження

Флуоресценція — це вид електромагнітної спектроскопії, що аналізує випромінювання зразка після його збудження світлом, зазвичай ультрафіолетовим. Процес починається з поглинання фотона молекулою, що призводить до збудження її електронного стану. Молекула втрачає вібраційну енергію, після чого повертається в основний стан, випромінюючи фотон. Випромінені фотони мають різну енергію, що дозволяє визначити структуру молекули.

Існують два основних типи приладів для флуоресцентної спектроскопії: флуорометри з фільтром та спектрофлуорометри з монохроматорами. Обидва типи використовують світло з джерела збудження, яке проходить через фільтри або монохроматор, взаємодіє із зразком, і частина світла поглинається, а частина флуоресціює.

Спектри емісії флуоресценції та флуоресценції збудження реєструвались за допомогою стаціонарного спектрофлуорометра QuantaMaster 40 Intensity Based Spectrofluorometer виробництва РТІ (HORIBA Scientific, Канада) за різних температур (295, 310 та 315 К), відповідно при  $\lambda_{зб} = 275$  нм та  $\lambda_{ем} = 355$  нм та (293, 303 та 313 К) при  $\lambda_{зб} = 275$  нм і  $\lambda_{ем} = 348$  нм, Рис. 2.2. В системі БСА з куркуміном (293, 303 і 313 К) при  $\lambda_{зб} = 274$  нм і  $\lambda_{ем} = 354$  нм.

В системі БСА з  $\text{CeO}_2$  вихідні стерильні розчини високої концентрації БСА та  $\text{CeO}_2$  розводились до необхідного співвідношення в об'ємі 1,5 мл перед експериментом. Концентрація БСА залишалися сталою ( $C_{БСА} = 2 \cdot 10^{-6}$  М), а концентрація  $\text{CeO}_2$  змінювалась ( $C_{\text{CeO}_2} = 0, 2 \cdot 10^{-5}, 5 \cdot 10^{-5}, 8 \cdot 10^{-5}, 10^{-4}, 2 \cdot 10^{-4}$  М).

В системі ЛСА з куркуміном вихідні розчини високої концентрації перед експериментом розводили у воді з ДМСО *ex tempore* до необхідного співвідношення в об'ємі 1.5 мл. Відсоток ДМСО в розчинах пропорційний концентрації куркуміну. Концентрація ЛСА залишалася постійною ( $C_{\text{ЛСА}}=2 \cdot 10^{-6}$  М), а концентрація куркуміну змінювалася:  $C_{\text{Куркумін}}= 0, 2.5 \cdot 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 7.5 \cdot 10^{-7}, 1 \cdot 10^{-6}, 1.5 \cdot 10^{-6}, 2 \cdot 10^{-6}, 3 \cdot 10^{-6}, 4 \cdot 10^{-6}$  М.



Рис. 2.2. Флуориметр QuantaMaster 40 Intensity Based Spectrofluorimeter [34].

Для отримання спектрів флуоресценції БСА з кверцетином вихідні розчини високої концентрації перед експериментом розводили у воді з диметилсульфоксидом (ДМСО) *ex tempore* до необхідного співвідношення в об'ємі 1.5 мл. Використання ДМСО як універсального органічного розчинника пов'язане з поганою розчинністю кверцетину. Відсоток ДМСО в розчинах пропорційний концентрації кверцетину. Концентрація БСА

залишалася постійною ( $C_{\text{БСА}} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ), а концентрація кверцетину змінювалася ( $C_{\text{Кверцетин}} = 0, 2.5 \cdot 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 7.5 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 2 \cdot 10^{-6}, 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ).

### 2.3. Методи визначення параметрів комплексоутворення

Дослідження механізмів комплексоутворення між сироватковими альбумінами, наночастинками діоксиду церію, кверцетином та куркуміном базується на фундаментальних фізико-хімічних теоріях. Вони дозволяють аналізувати процеси гасіння флуоресценції, оцінювати ступінь зв'язування молекул і визначати термодинамічні характеристики взаємодії.

#### *Теорія Штерна-Вольмера: механізм гасіння флуоресценції*

Флуоресценція є чутливим методом для дослідження міжмолекулярних взаємодій. Під впливом гасників інтенсивність випромінювання може зменшуватися за рахунок динамічного або статичного гасіння. Динамічне гасіння відбувається під час зіткнення молекул у збудженому стані, тоді як статичне передбачає утворення стабільного комплексу між білком і лігандом. Визначення константи гасіння дозволяє оцінити силу взаємодії білка з наночастинками або кверцетином, а також встановити тип гасіння (107,108).

#### *Теорія Хілла: кооперативність зв'язування*

У багатьох біологічних системах зв'язування молекул не є незалежним процесом, а може впливати на наступні акти зв'язування. Якщо приєднання першої молекули ліганда змінює ймовірність зв'язування наступних, говорять про кооперативний ефект. Позитивна кооперативність означає, що перший ліганд полегшує зв'язування наступних, що часто спостерігається у білкових комплексах. Негативна

кооперативність, навпаки, вказує на зменшення спорідненості до наступних молекул. Визначення цього параметра дозволяє краще зрозуміти механізм взаємодії між білком та досліджуваними агентами (109).

### ***Теорія Фьорстера: резонансний перенос енергії***

Резонансний перенос енергії застосовується для аналізу просторових змін білкової структури при зв'язуванні лігандів. Якщо донор і акцептор енергії знаходяться на відстані, що дозволяє ефективний перенос енергії, відбувається зміна інтенсивності та спектру флуоресценції. Цей метод дає змогу оцінити, чи спричиняє зв'язування наночастинок або кверцетину конформаційні зміни білка, що є важливим для розуміння його функціональних властивостей (110,111).

### ***Теорія Вант-Гоффа: термодинаміка комплексоутворення***

Вивчення температурної залежності взаємодії дозволяє визначити енергетичні характеристики процесу. Якщо взаємодія супроводжується виділенням тепла, це свідчить про екзотермічний процес, характерний для гідрофобних і електростатичних взаємодій. Якщо ж для утворення комплексу необхідне поглинання тепла, процес є ендотермічним і може бути обумовлений змінами у водневих зв'язках або полярних взаємодіях. Аналіз термодинамічних параметрів дозволяє встановити природу зв'язування між білком та досліджуваними речовинами (107,108,110,111).

## **2.4. Комп'ютерне моделювання**

Інформація про структуру біологічних мішеней, що використовуються для розробки лікарських засобів за допомогою

молекулярного докінгу, зібрана в єдину базу даних, відому як RCSB Protein DataBank (112).

Молекулярний докінг — це метод, що полягає в орієнтації однієї молекули відносно іншої для утворення стабільного комплексу. Визначення оптимального просторового розташування молекул дає можливість оцінити їх зв'язуючу спорідненість за допомогою так званої скорінг-функції. Цей метод є одним із найпоширеніших у структурному дизайні лікарських засобів, оскільки дозволяє прогнозувати конформації зв'язування малих молекул ліганда з молекулою мішені в найбільш вигідному місці для зв'язування. Аналіз зв'язування є важливим етапом у раціональному проєктуванні ліків і допомагає зрозуміти основні біохімічні процеси при взаємодії молекул (113–115).

Скорінг-функції можна класифікувати за типом використовуваних рівнянь та параметрів, подібно до силових полів. Скорінг-функції, засновані на фізичних розрахунках, враховують нековалентні взаємодії за допомогою силового поля, з поправками на водневі зв'язки, що є важливими в процесах молекулярного розпізнавання. Проте такі функції мають недолік — вони не враховують розчинник. Цю проблему вирішено завдяки використанню енергетичних інкрементів сольватації, які розраховуються за допомогою моделей розчинників Пуассона-Больцмана (Poisson-Boltzmann, PB) або узагальненої Борновської (Generalized Born, GB).

Програмне забезпечення AutoDock 4.2 та Glide використовувалось для моделювання методом молекулярного докінгу комплексів БСА-куркумін з метою встановлення мод зв'язування та енергії взаємодії молекул у комплексі.

Для дослідження комплексоутворення протеїну та ліганду було виконано моделювання молекулярного докінгу в програмному пакеті AutoDock 4.2 з генетичним алгоритмом Ламаркіана та емпіричною

скорінг-функцією для пошуку мод зв'язування. Моделювання молекулярної динаміки було виконано у програмному пакеті Desmond з полем сил OPLSe.

Для квантово-хімічного моделювання молекули куркуміну був використаний програмний пакет Gaussian 09W. Для оптимізацій геометрії молекули, визначення розподілу зарядів, формування молекулярних орбіталей та встановлення їх енергетичних рівнів застосовувався метод функціонала густини (DFT) з функціоналом CAM-B3LYP і базисним набором 3-21G.

Метод функціонала густини (DFT) є квантово-хімічним методом, що використовується для обчислення електронної структури атомів, молекул і твердих тіл. Основним принципом цього методу є заміна складного багаточастинкового хвильового рівняння для електронів на еквівалентне одночастинкове рівняння, яке описує електронну густину. Цей функціонал густини може бути апроксимований за допомогою різних функцій, таких як функціонал локальної густини або функціонал густини, що залежить від градієнта. Метод DFT є широко використовуваним для моделювання електронної структури завдяки своїй здатності обчислювати властивості матеріалів з високою точністю при відносно низьких обчислювальних витратах.

В Розділі 2 представлено опис об'єктів дослідження та експериментальних методик, використаних під час виконання роботи: оптичного поглинання, флуоресценції, теорій визначення параметрів комплексоутворення та комп'ютерного моделювання.

## РОЗДІЛ 3

### КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БСА З ДІОКСИДОМ ЦЕРІЮ $\text{CeO}_2$

#### 3.1. Оптичні властивості БСА при взаємодії з наночастинками $\text{CeO}_2$ : поглинання та флуоресценція

У спектрах оптичної густини БСА у фізіологічному розчині (рис. 3.1) для різних концентрацій альбуміну спостерігається широкий пік у УФ-діапазоні. Для деяких концентрацій видно два максимуми поглинання – при  $\lambda_{\text{max}} = 240$  нм та  $\lambda_{\text{max}} = 280$  нм. На відміну від цього, у водних розчинах максимум смуги оптичного поглинання чітко розташований біля  $\lambda_{\text{max}} = 280$  нм.

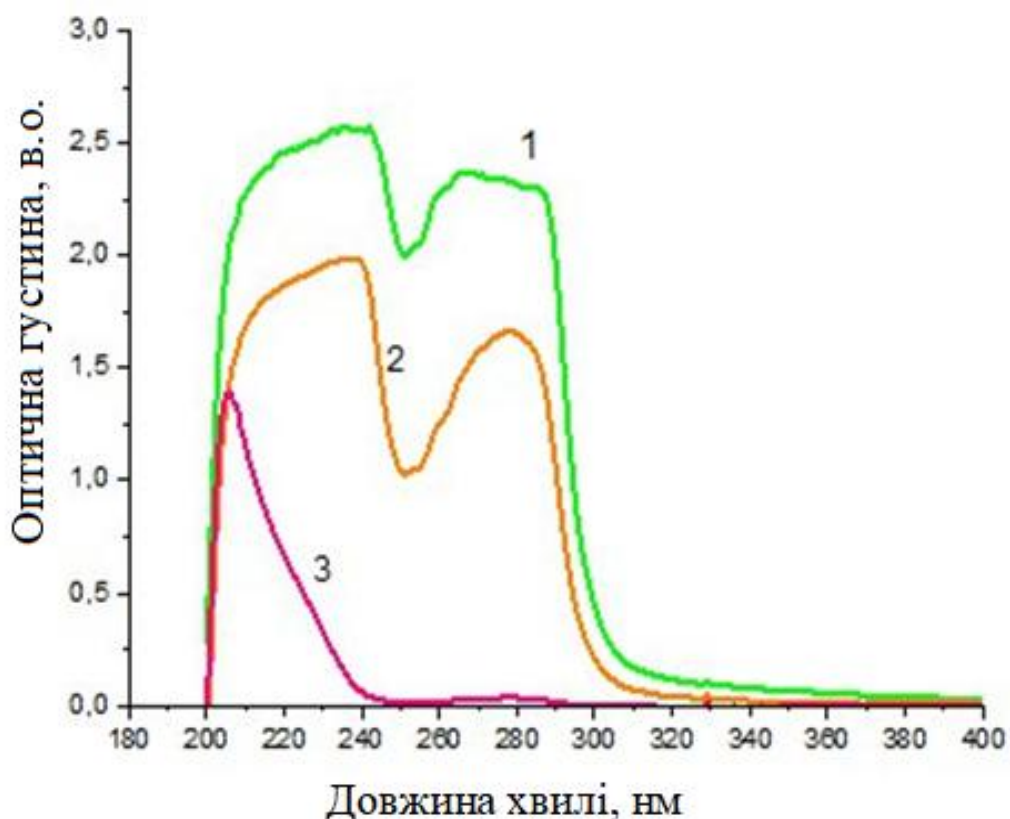


Рис.3.1. Спектри оптичної густини фізіологічних розчинів БСА різної концентрації ( $C_{\text{БСА}} = 10^{-4}$  (1);  $5 \cdot 10^{-5}$  (2);  $10^{-6}$  (3) М (рН = 5.5) ).

Різниця у положенні максимумів оптичного поглинання БСА у фізіологічному та водному розчинах може бути зумовлена відмінностями в хімічному складі розчинника. Зокрема, фізіологічний розчин має рН = 5.5, тоді як водний розчин – рН = 7.4. Відомо, що при рН > 4.7 молекули БСА набувають негативного заряду, що може впливати на їх оптичні властивості (13).

Отримані спектри оптичного поглинання наночастинок  $\text{CeO}_2$  у фізіологічному розчині наведені на рис.3.2. З графіка видно, що наночастинки  $\text{CeO}_2$  характеризуються широким піком поглинання при  $\lambda_{\text{max}}=290$  нм. На відміну від спектрів оптичного поглинання в фізіологічному розчині, НЧ  $\text{CeO}_2$  в водному розчині мають пік поглинання близько 350 нм. Відмінність може бути зумовлена різними розчинниками та розміром НЧ. Значення оптичної густини спадає при зменшенні концентрації НЧ у розчині.

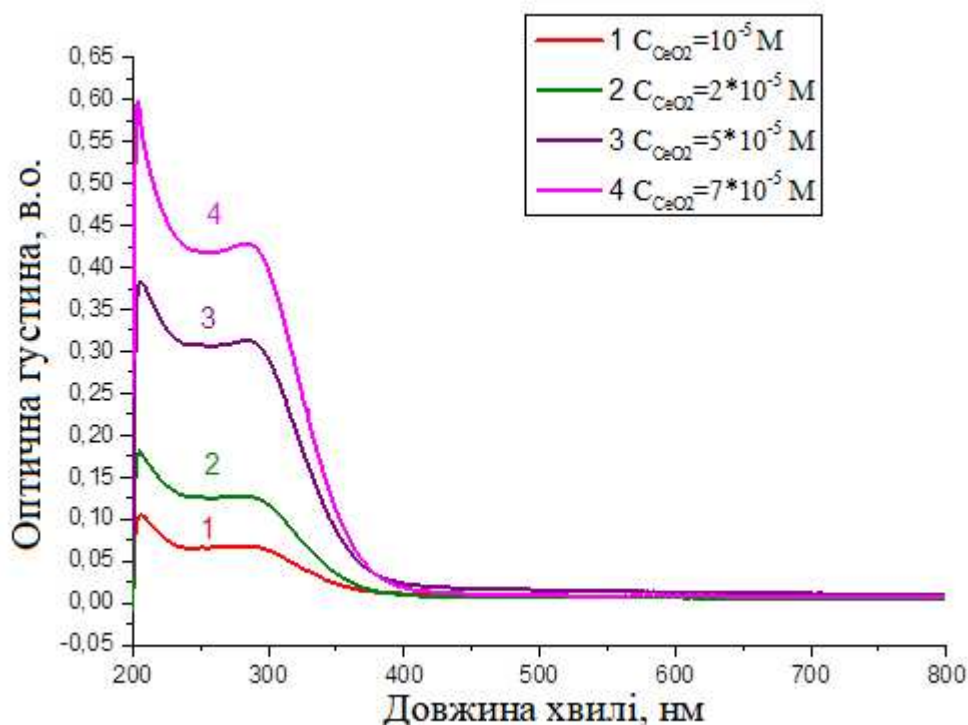


Рис.3.2. Спектри оптичної густини фізіологічних розчинів  $\text{CeO}_2$  різної концентрації ( $C_{\text{CeO}_2}= 10^{-5}$ (1),  $2 \cdot 10^{-5}$ (2),  $5 \cdot 10^{-5}$ (3),  $7 \cdot 10^{-5}$ (4) М) (рН = 5.5;  $T=295$  К).

Спектри емісії флуоресценції та флуоресценції збудження для зразків БСА у воді (рис.3.3 (а)) та фізіологічному розчині (рис. 3.3 (б)) були отримані за кімнатної температури.

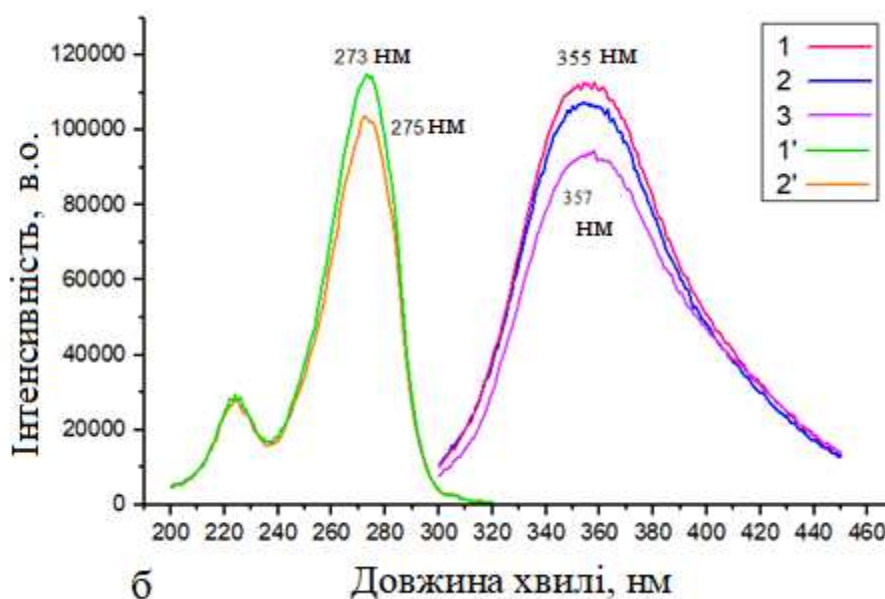
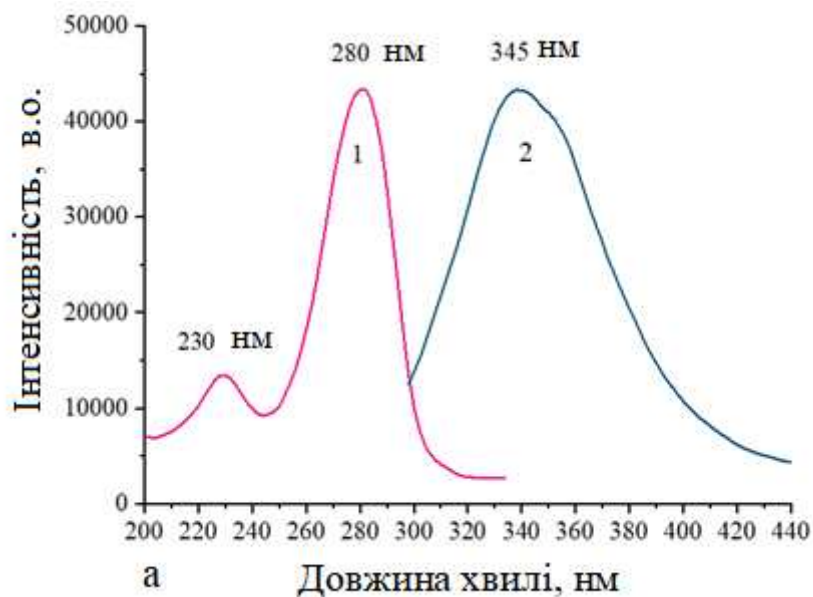


Рис. 3.3. Спектри емісії флуоресценції ( $\lambda_{зб} = 280$  нм) і флуоресценції збудження ( $\lambda_{ем} = 345$  нм) БСА з концентрацією  $C_{БСА} = 2 \cdot 10^{-6}$  М у воді (а) та у фізіологічному розчині NaCl (0.9%) з  $\lambda_{зб} = 275$  нм (1),  $\lambda_{зб} = 273$  нм (2),  $\lambda_{зб} = 280$  нм (3) та  $\lambda_{ем} = 357$  нм (1'), та  $\lambda_{ем} = 355$  нм (2'). (рН 5.5, T = 294 К).

Положення максимумів емісії флуоресценції та флуоресценції збудження незначно залежить від вибраних значень  $\lambda_{36}$  і  $\lambda_{em}$ . При цьому для розчинів БСА у воді пік емісії спостерігається поблизу 345 нм, а максимум поглинання – близько 280 нм. У разі використання фізіологічного розчину найінтенсивніші максимуми розташовані біля  $\lambda_{em} = 355$  нм і  $\lambda_{36} = 273$  нм. Таким чином, положення піків флуоресценції визначається типом розчинника, що свідчить про їхню взаємодію з БСА, супроводжуючись конформаційними змінами у структурі альбуміну. Отримані значення положення піків флуоресценції добре узгоджуються з максимумами смуги поглинання у спектрі оптичної густини.

Також проводились дослідження емісії флуоресценції (рис.3.4 (а)) та збудження флуоресценції (рис.3.4 (б)) для НЧ  $\text{CeO}_2$  при кімнатній температурі при  $\lambda_{36} = 297$  нм та  $\lambda_{em} = 410$  нм.

З рис. 3.4 видно, що в спектрах емісії флуоресценції фізіологічних розчинів  $\text{CeO}_2$  спостерігається пік при 410 нм, а в спектрах флуоресценції збудження – максимум поглинання при  $\lambda = 297$  нм. Помітно, що зі зменшенням концентрації наночастинок у розчині інтенсивність флуоресценції знижується. Крім того, пік поглинання у спектрі флуоресценції збудження зміщений на 7 нм у довгохвильову область відносно смуги поглинання спектру оптичної густини.

На рис.3.5 приведені спектри збудження та емісії флуоресценції фізіологічних розчинів БСА- $\text{CeO}_2$  за фіксованої концентрації протеїнової складової та зростаючої концентрації наночастинок при різних температурах.

Як видно, у спектрах збудження спостерігаються піки біля 230 нм та 280 нм. У спектрах емісії наявний широкий пік при 348 нм. В результаті FRET зменшується квантовий вихід флуоресценції триптофанових амінокислотних залишків Trp-134 та Trp-213 макромолекули БСА.

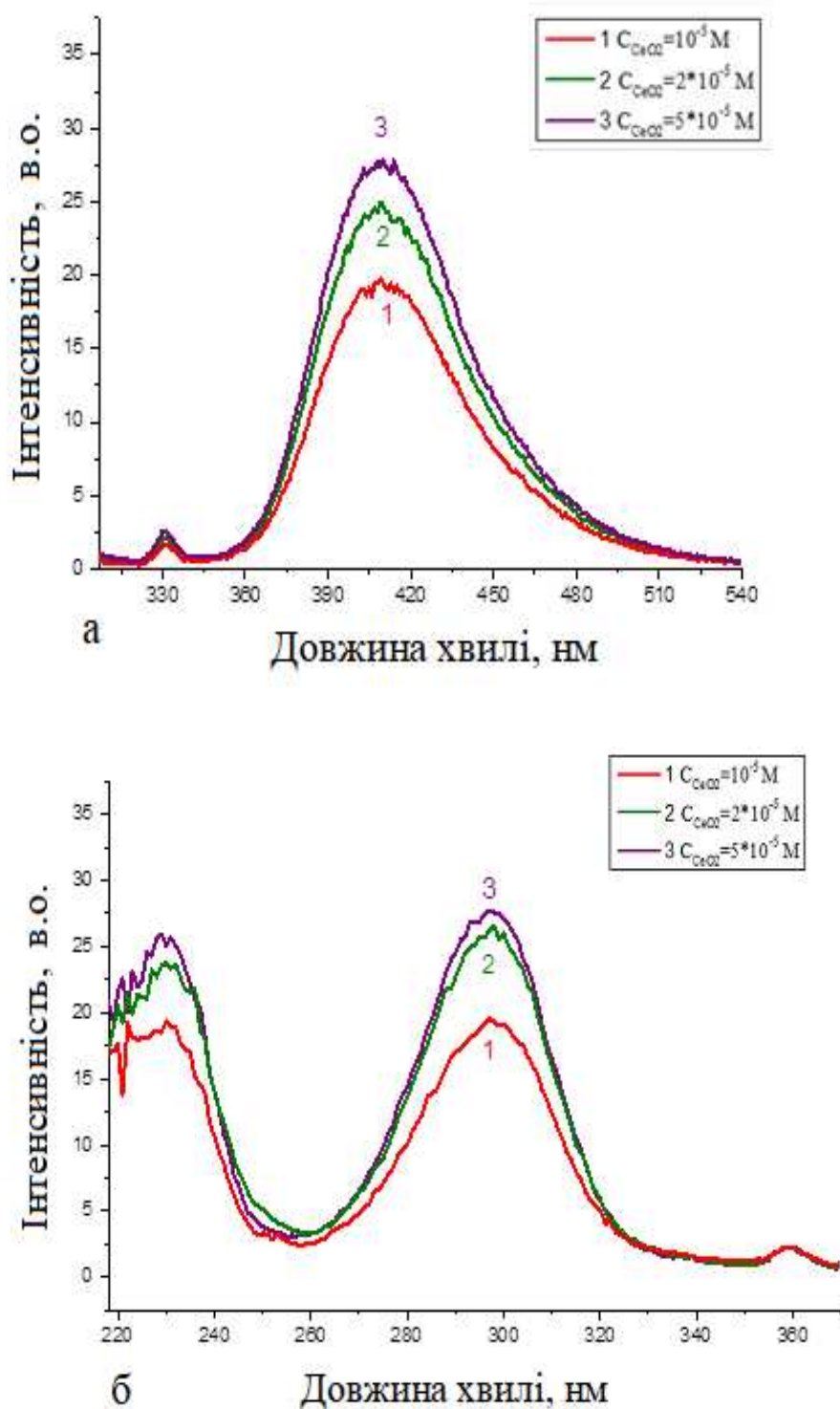
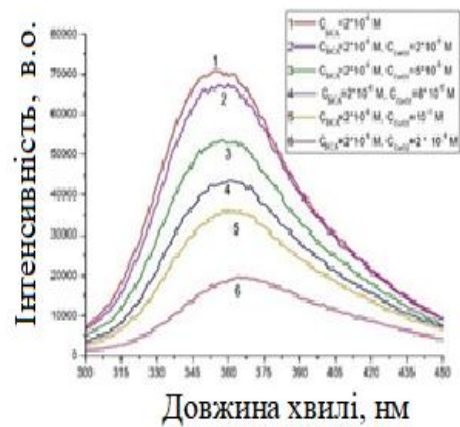
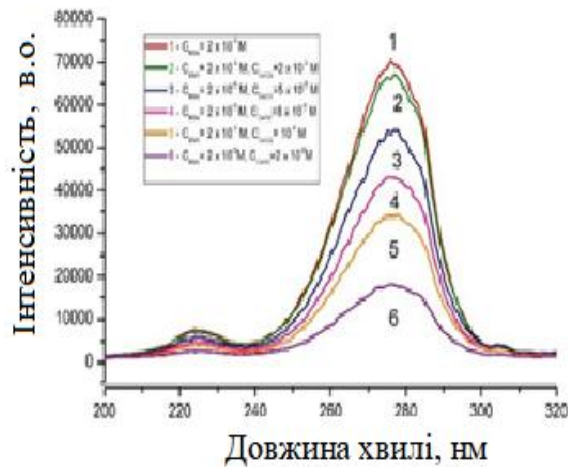
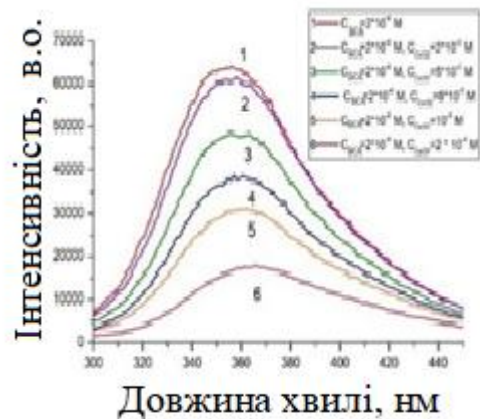
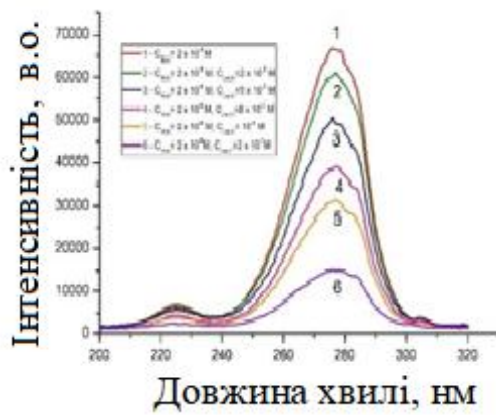


Рис.3.4. Спектри емісії флуоресценції (а) та флуоресценції збудження (б) фізіологічних розчинів  $\text{CeO}_2$  різної концентрації ( $C_{\text{CeO}_2} = 10^{-5}$  (1),  $2 \cdot 10^{-5}$  (2),  $5 \cdot 10^{-5}$  (3) М), ( $\text{pH} = 5.5$ ;  $T = 295$  К;  $\lambda_{\text{зб}} = 297$  нм,  $\lambda_{\text{ем}} = 410$  нм).



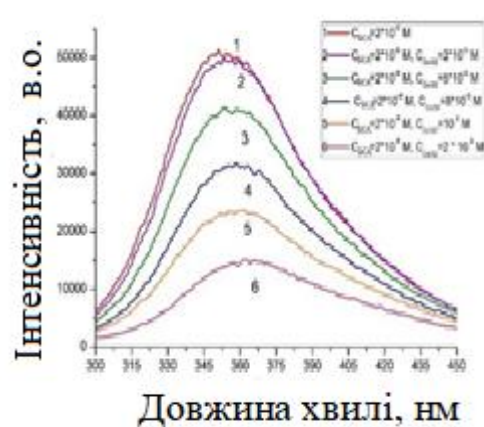
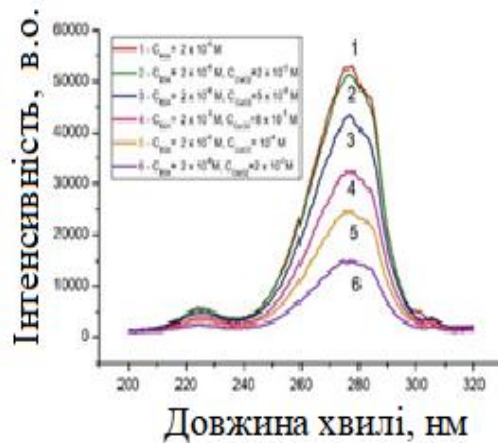
а

б



в

г



д

е

Рис.3.5. Спектри флуоресценції збудження (а, в, д) та емісії флуоресценції (б, г, е) для фізіологічних розчинів БСА- $\text{CeO}_2$  при  $C_{\text{БСА}}=2 \cdot 10^{-6} \text{ M} = \text{const}$  і  $C_{\text{CeO}_2} = 0, 2 \cdot 10^{-5}, 5 \cdot 10^{-5}, 8 \cdot 10^{-5}, 10^{-4}, 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  за температури  $T=295 \text{ K}$ (а,б),  $305 \text{ K}$ (в,г),  $315 \text{ K}$ (д,е),  $\lambda_{\text{зб}} = 275 \text{ nm}$  та  $\lambda_{\text{ем}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\text{pH} = 5.5$ .

Внаслідок цього при зростанні концентрації наночерію у розчині спостерігається гасіння флуоресценції БСА. Крім того, також у спектрі емісії спостерігається червоний зсув  $\Delta\lambda \approx 15$  нм, що свідчить про зв'язування наночастинки близько тирозинового амінокислотного залишку та збільшення полярності середовища (116), що підтверджується результатами докінгу (117–119).

### 3.2. Моделювання взаємодії альбумінів з наночастинками $\text{CeO}_2$

Молекулярна структура БСА для докінг-моделювання взята з RCSB PDB Protein Data Bank (120). Моделі стехіометричних наночастинок  $\text{CeO}_2$  були побудовані з одиничної комірки кристалічної структури об'ємного церіуму діоксиду (38) у програмному пакеті Vesta (version 3).

Частинки різної форми були отримані шляхом обрізання за кристалографічними площинами  $\{111\}$ ,  $\{110\}$ ,  $\{101\}$  та  $\{011\}$ . Згідно з теоретичним дослідженням [20], нанорозмірний  $\text{CeO}_2$  зберігає кристалічну структуру об'ємного матеріалу, хоча зі зменшенням розмірів спостерігається незначне розширення впорядкованості. Використані кубічна та багатогранна форми частинок були чисельно проаналізовані у [18], що підтверджує коректність обраного наближення. Крім того, як зазначено у [21], під час моделювання не враховувався вплив вакансій кисню при зменшенні розміру частинок, і  $\text{CeO}_2$  вважався строго стехіометричним матеріалом. У результаті отримані кубічні (78 атомів, розмір 1,5 нм) та багатогранні (240 атомів, розмір 2,5–3 нм) наночастинки (рис.3.6), форма яких була обрана з урахуванням даних теоретичного дослідження (121).

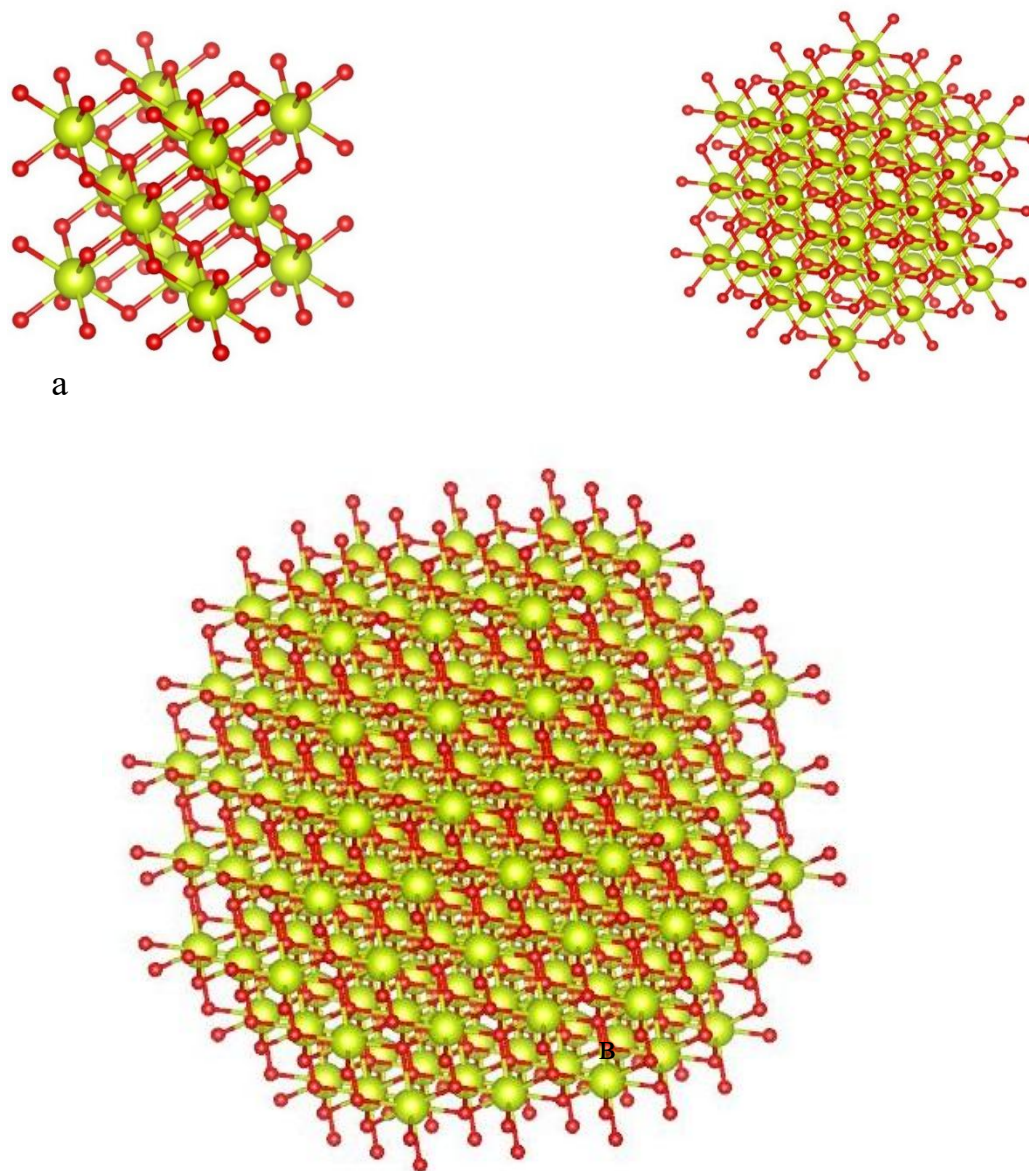


Рис.3.6. Наночастинки CeO<sub>2</sub>: (а) кубічна з характерним розміром 1 нм (78 атомів), (б) сферична з характерним розміром 2 нм (239 атомів), (в) сферична з характерним розміром 3 нм (777 атомів).

На рис.3.7 представлений результат моделювання комплексу макромолекули БСА та кубічної наночастинки діоксиду церію, а саме одна найоптимальніша конформація з знайдених в AutoDock 4.2. Червоним кольором зображені триптофанові амінокислотні залишки Trp213 та Trp134, які відповідають за флуоресцентні властивості БСА.

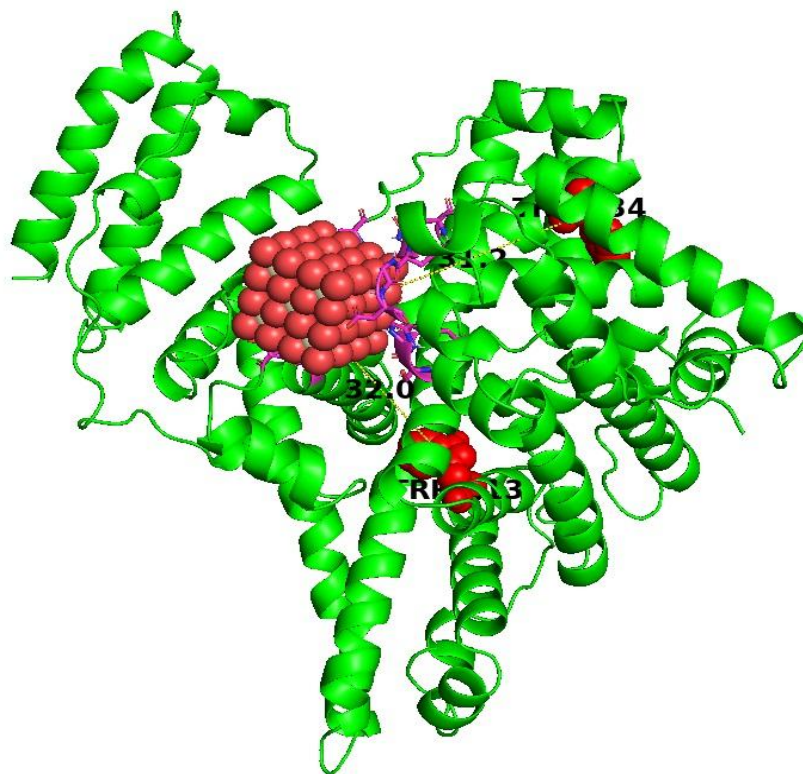


Рис.3.7. Комплекс кубічної наночастинки  $\text{CeO}_2$  (розмір 1.5 нм) та молекули БСА. Червоним кольором позначені Trp-134 та Trp-213.

Відстань до них від наночастинки дорівнюють 3.2 нм та 3.12 нм, відповідно. Енергія зв'язування дорівнює  $\Delta G \approx -32.85$  кДж/Моль, головний внесок в яку, відповідно до результатів моделювання, дають ван-дер-ваальсівська взаємодія та водневі зв'язки. Зокрема, на рис.3.8 приведені найближче оточення амінокислотних залишків навколо наночастинки. До найближчого оточення відносяться GLN-33, ASP-86, GLY-85, TYR-84, SER-104, HIS-105, LYS-106, ASP-107, ASP-111, LYS-465 та THR-466, тобто частинка розташовується серед полярних амінокислотних залишків (рис. 3.8).

Аналогічно, приведемо результати моделювання сферичного (багатогранного) нанокластера  $\text{CeO}_2$  розміром 2.5-3 нм з макромолекулою БСА.

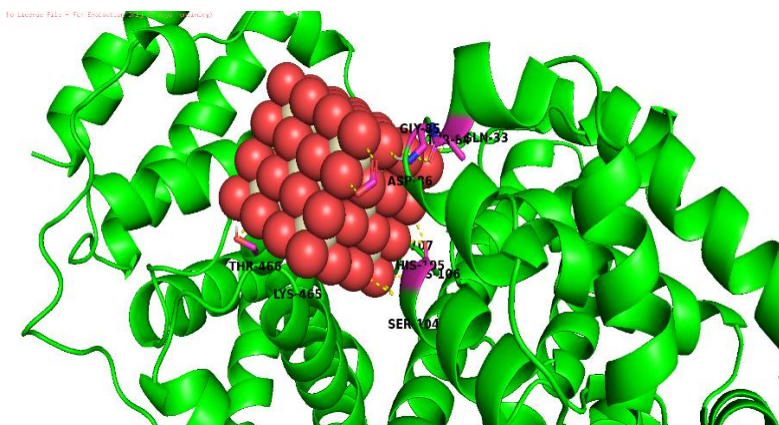


Рис.3.8. Оточення кубічної наночастинки  $\text{CeO}_2$  на відстані 4 Å. Жовтим пунктиром позначені водневі зв'язки між оточуючими амінокислотними залишками та наночастинкою.

На рис. 3.9 приведені оптимальне взаємне розташування компонентів комплексу. Як видно з рис. 3.9 та 3.7, розташування нанокластера дещо змінилось.

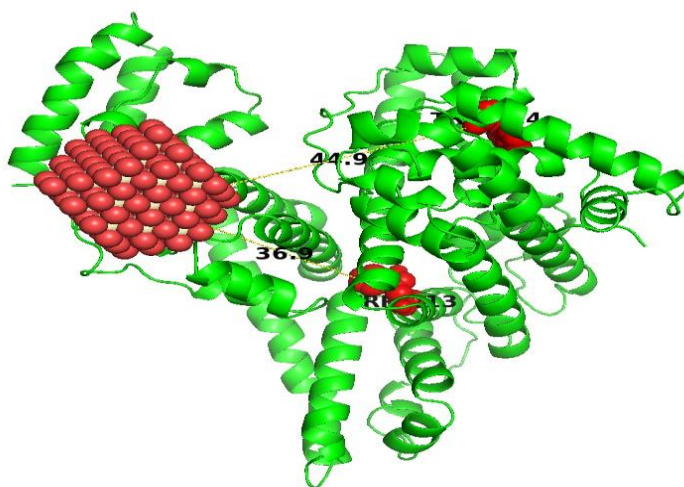


Рис.3.9. Комплекс сферичної (багатогранної) наночастинки  $\text{CeO}_2$  (розмір 2.5-3 нм) та молекули БСА. Червоним кольором позначені Trp-134 та Trp-213.

Тепер відстані до триптофанових амінокислотних залишків 3.7 нм та 4.5 нм, відповідно. Енергія зв'язування з БСА дорівнює  $\Delta G \approx -39.98$  кДж/моль. Аналогічно попередньому випадку, головний внесок у

енергію взаємодії дає ван-дер-ваальсівська взаємодія та водневі зв'язки. На рис. 3.10 представлено найближче оточення сферичної частинки у комплексі з БСА.

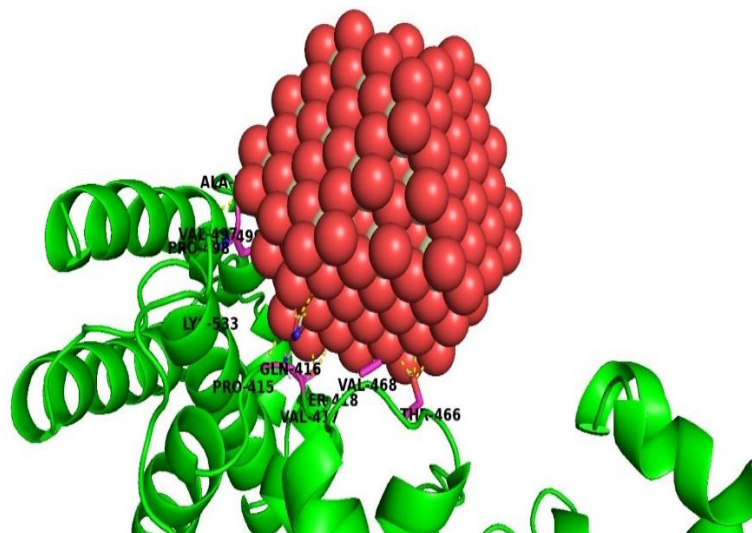


Рис.3.10. Оточення сферичної наночастинки  $\text{SeO}_2$  на відстані 4 Å.

Амінокислотні залишки в оточенні – PRO-415, GLN-416, VAL-417, SER-418, THR-466, VAL-468, VAL-497, PRO-498, LYS-499, ALA-500, LYS-533. Жовтим пунктиром позначені водневі зв'язки між даними амінокислотними залишками та наночастинкою.

Варто зазначити, що розрахунки проводились у наближенні жорсткої структури макромолекули протеїну, тобто амінокислотні залишки вважались зафіксованими. Структура наночастинок також вважалась незмінною. Для нанокластерів порівняно невеликого розміру (до 2 нм) моделювання продемонструвало можливість утворення комплексів, відповідно енергія зв'язування є від'ємною. Для сферичного нанокластера розміром порядку 3 нм також одержаний результат. Нанокластер такого розміру є значним у розмірі в порівнянні з молекулою протеїну (див. рис.3.11), тому для одержання комплексу процес моделювання необхідно уточнювати, зокрема врахувавши можливість зміни положення амінокислотних залишків при взаємодії з наночастинкою.

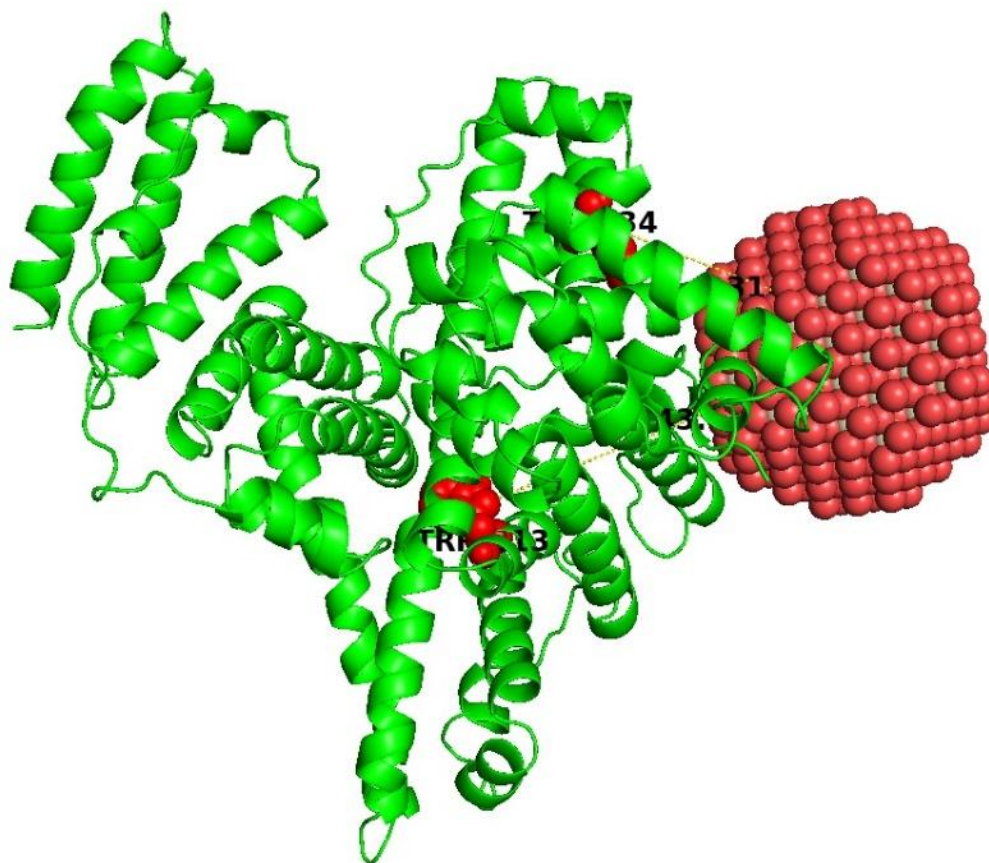


Рис. 3.11. Наночастинка  $\text{CeO}_2$  та молекула БСА.

Результати моделювання можна порівняти з результатами розрахунків, отриманих на основі експериментальних спектрів емісії флуоресценції фізіологічних розчинів БСА та наночастинок  $\text{CeO}_2$  та спектру оптичного поглинання  $\text{CeO}_2$  в фізіологічному розчині.

Для порівняння проаналізована молекулярна структура ЛСА за допомогою докінг-моделювання, молекула була взята з RCSB PDB Protein Data Bank (122). На відміну від БСА, у ЛСА присутній лише один триптофановий амінокислотний залишок — Trp-214. Комплекс ЛСА з кубічною наночастиною  $\text{CeO}_2$  розміром 1,4 нм, отриманий у результаті моделювання, представлений на рис. 3.12.

Відстань до згаданого триптофанового залишку становить 3,35 нм. Енергія зв'язування з молекулою ЛСА  $\Delta G \approx -39,47$  кДж/моль, що свідчить про більш інтенсивну взаємодію порівняно з БСА. Як і в попередньому

випадку, основний вклад у взаємодію вносять ван-дер-ваальсівські сили та водневі зв'язки.

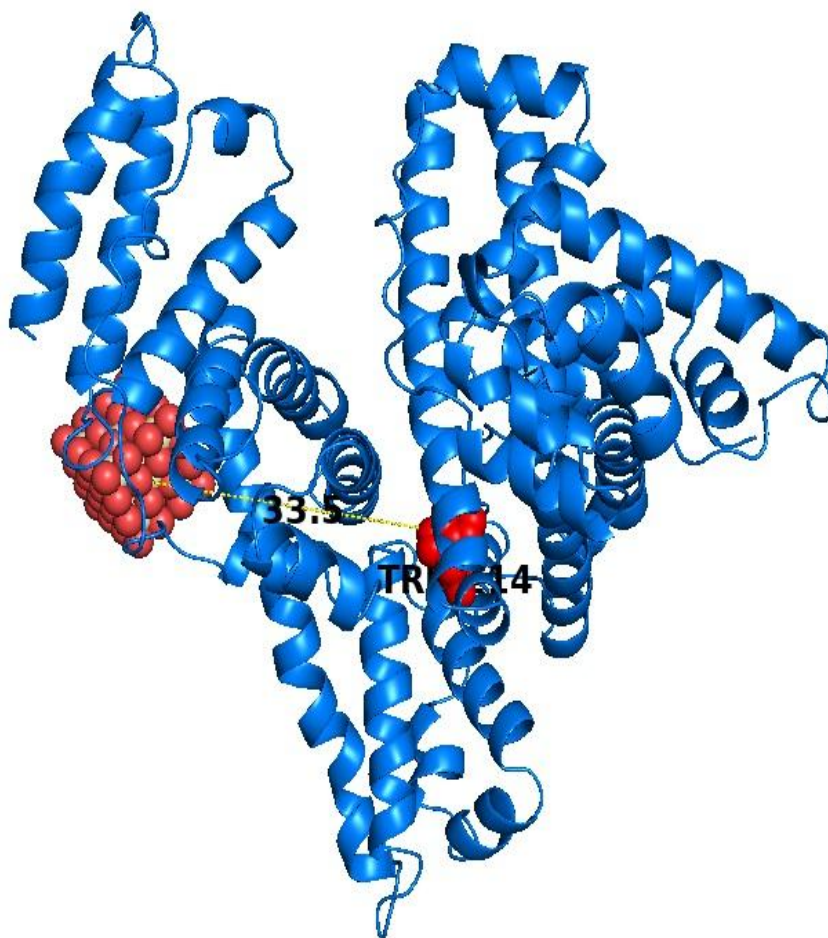


Рис.3.12. Комплекс кубічної наночастинки  $\text{CeO}_2$  з молекулою ЛСА.

Результати моделювання узгоджуються з експериментальними даними, наведеними в (123). На рис. 3.13 показано найближче оточення амінокислотних залишків навколо наночастинки, зокрема GLN-390, GLU-393, LEU-394, GLN-397, ALA-406, ARG-410, LYS-413, VAL-409, THR-540, LYS-541, GLU-542, LYS-545. Також зазначені водневі зв'язки між наночастинкою  $\text{CeO}_2$  та амінокислотними залишками з найближчого оточення.

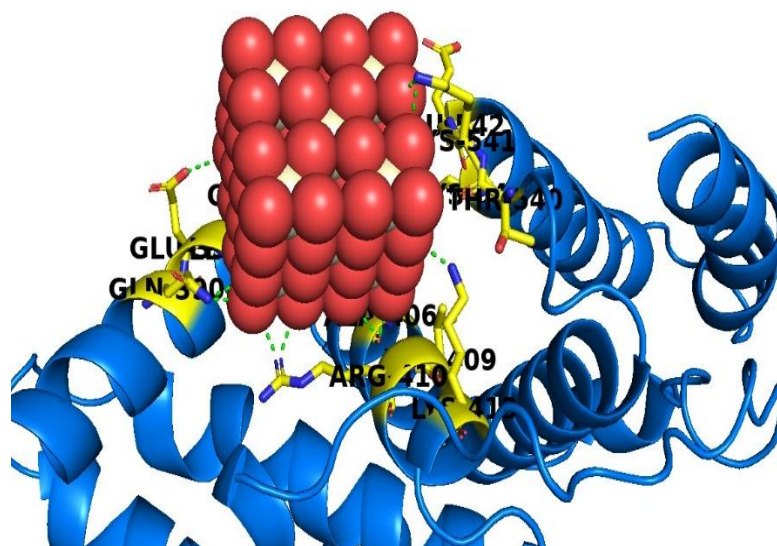


Рис.3.13. Найближче оточення кубічної наночастинки  $\text{CeO}_2$  на відстані 4 Å. Зеленим пунктиром позначені водневі зв'язки.

Комплекс ЛСА з сферичною наночастинкою  $\text{CeO}_2$  розміром 2 нм приведений на рис. 3.14.

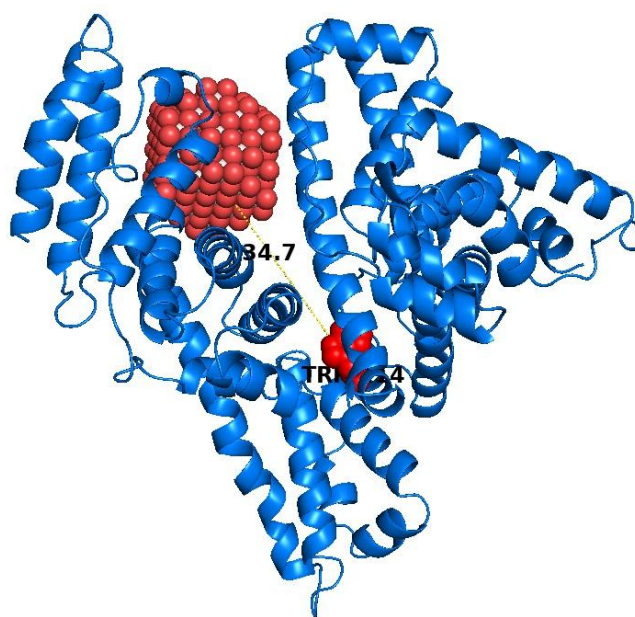


Рис. 3.14. Комплекс сферичної наночастинки  $\text{CeO}_2$  з молекулою ЛСА.

Відстань до триптофанового залишку 3.47 нм. Енергія зв'язування з молекулою ЛСА  $\Delta G \approx -42.63$  кДж/моль. Головний внесок у взаємодію

дають ван-дер-ваальсівська взаємодія та водневі зв'язки. На рис. 3.15 вказане найближче оточення амінокислотних залишків навколо наночастинки, а саме PRO-180, ASP-183, ASP-187, PHE-395, GLY-399, GLU-400, TYR-401, SER-435, GLU-518, LYS-519, GLN-522.

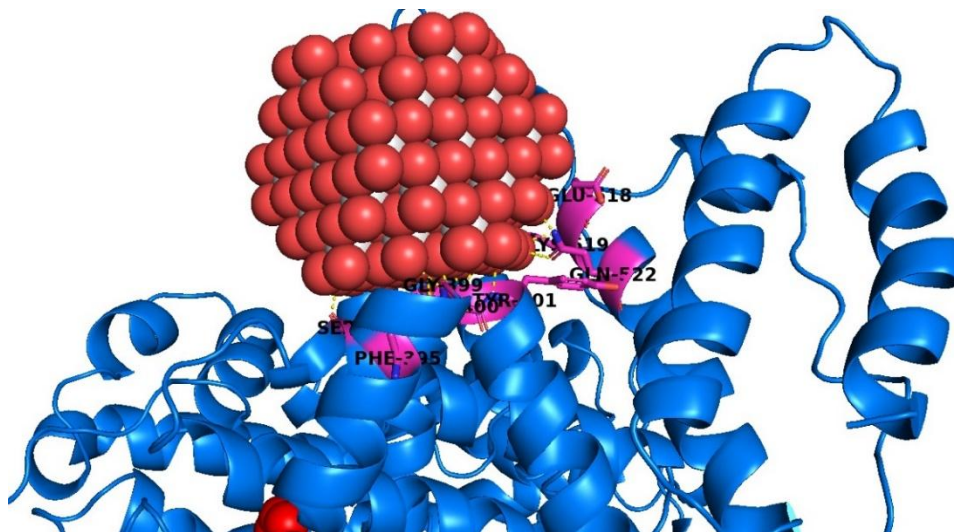


Рис.3.15. Найближче оточення сферичної наночастинки  $\text{SeO}_2$  на відстані 4 Å. Жовтим пунктиром позначені водневі зв'язки.

Необхідно зазначити, що розрахунки виконувались з припущенням жорсткої структури макромолекули протеїну, тобто амінокислотні залишки вважались фіксованими. Також структура наночастинок залишалась незмінною. Моделювання для порівняно малих нанокластерів (до 2 нм) показало можливість утворення комплексів, при цьому енергія зв'язування виявляється від'ємною. Аналогічний результат отримано і для сферичного нанокластера розміром близько 3 нм. Цей розмір значно більший, ніж молекула протеїну (див. рис. 3.11), тому для отримання комплексу потрібно уточнити процес моделювання, зокрема врахувавши можливість змін у положенні амінокислотних залишків під час взаємодії з наночастинкою (117).

### 3.3. Встановлення параметрів гасіння та зв'язування в розчинах БСА з наночастинками $\text{CeO}_2$

Для встановлення середньої відстані від наночастинки діоксиду церію (акцептор) до триптофанових амінокислотних залишків (донорів) Trp-213 та Trp-134 потрібно скористатись теорією Фьорстера нерадіаційної резонансної передачі енергії (FRET). FRET – електродинамічне явище, що виникає між молекулами донора у збудженому стані та акцептора в основному стані як результат далекодіючої диполь-дипольної взаємодії (109) та супроводжується передачею енергії без появи фотона.

Ефективність  $E$  перенесення енергії збудження від донора (БСА) до акцептора ( $\text{CeO}_2$ ) обернено пропорційний шостій степені відстані  $r$  між ними та залежить від відстані  $R_0$ , за якої ефективність перенесення енергії складає 50% наступним чином:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (3.1)$$

де  $F_0$ ,  $F$  – інтенсивності флуоресценції в максимумі смуги емісії донора (БСА) у відсутності та присутності гасника (наночастинка), відповідно. Відстань  $r$ , за якої можна говорити про ефективне перенесення енергії, має мати значення до 10 нм та задовольняти вимогу  $0.5R_0 < r < 1.5R_0$  (109). Відстань  $R_0$  визначається через інтеграл перекриття між спектрами флуоресценції донора (БСА) (рис.3.5) і поглинання акцептора ( $\text{CeO}_2$ ) (рис.3.2) :

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} k^2 \Phi N^{-4} \quad (3.2)$$

де  $k^2 = 2/3$  – множник, що описує усереднену відносну просторову орієнтацію дипольних моментів молекул донора та акцептора,  $N$  – показник заломлення середовища та дорівнює 1.36 для даної системи,  $\Phi = 0.15$  – квантовий вихід донора.

Інтеграл перекриття  $J$  спектрів визначається з наступного співвідношення:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (3.3)$$

де  $F(\lambda)$  і  $\varepsilon(\lambda)$  – значення інтенсивності емісії флуоресценції водного розчину БСА та  $\text{CeO}_2$  і молярного коефіцієнта екстинкції фізіологічного розчину наночастинок диоксиду церію. Спектри  $F(\lambda)$  і  $\varepsilon(\lambda)$  приведені на рис. 3.16.

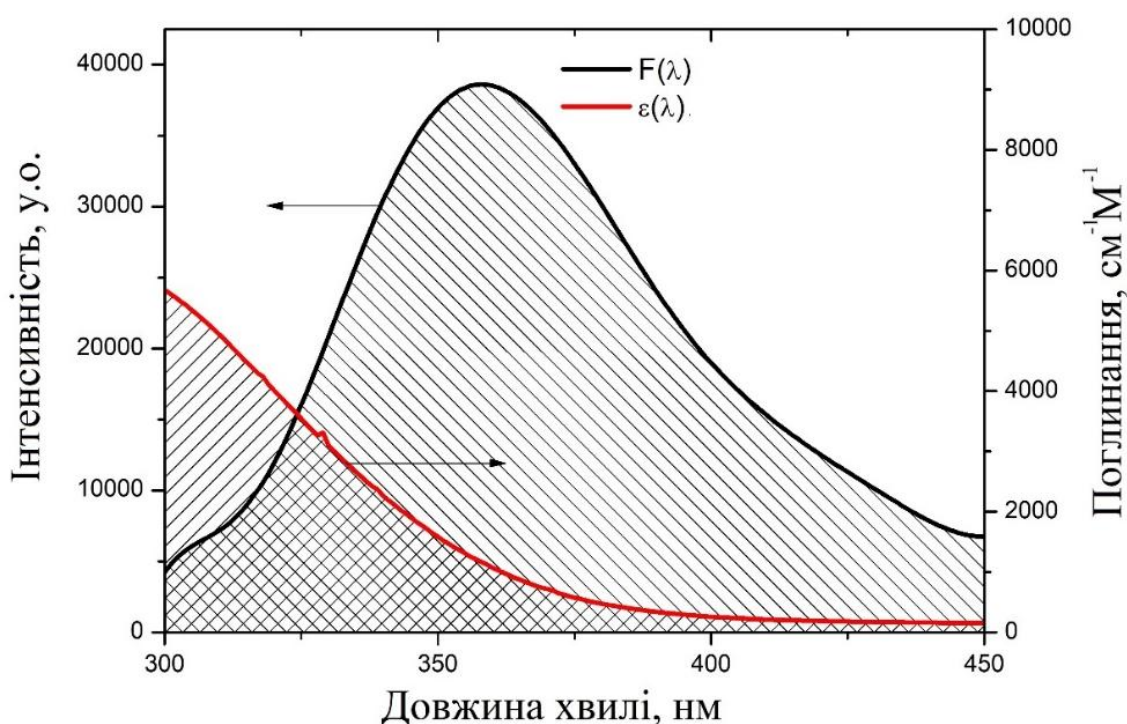


Рис. 3.16. Перекриття спектрів емісії флуоресценції водного розчину БСА ( $C_{\text{БСА}}=2 \cdot 10^{-6}$  М) та поглинання водного розчину  $\text{CeO}_2$  ( $C_{\text{CeO}_2} = 7 \cdot 10^{-5}$  М) при 295 К.

Одержане з (3.3) значення інтеграла перекриття  $J \approx 1.688 \times 10^{-15} \text{М}^{-1} \text{см}^3$ . Підставивши його у (3.2) та використовуючи (3.1), отримуємо значення  $R_0 \approx 5.9$  nm,  $r \approx 6.1$  nm. Дані значення дещо відрізняються від отриманих з молекулярного докінгу відстаней між наночастиною та БСА, однак узгоджуються якісно – відстані у декілька

нанометрів - та підтверджують можливість нерадіаційної передачі енергії збудження від донора (БСА) до акцептора ( $\text{CeO}_2$ ) у комплексі.

Існують динамічний та статичний механізми гасіння флуоресценції, які передбачають безпосередній контакт флуорофора (триптофан) та гасника ( $\text{CeO}_2$ ). Динамічний механізм гасіння обумовлений зіткненнями без випромінювання фотона та описується рівнянням Штерна-Вольмера (117,124–126) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]. \quad (3.4)$$

де  $\tau_0$  є часом життя збудженого рівня молекули БСА та дорівнює  $1 \cdot 10^{-8}$  s.

Константи гасіння  $K_q$  and  $K_{SV}$  можуть бути знайдені з спектрів емісії флуоресценції фізіологічних розчинів БСА та БСА- $\text{CeO}_2$  при різних температурах та концентраціях наноцерію  $C_{\text{CeO}_2} = [Q]$  з лінійної апроксимації експериментальних точок (див. рис. 3.17). Лінійні залежності Штерна-Вольмера характерні для випадку наявності одного типу флуорофора.

Результати, отримані з теорії Штерна – Вольмера, приведені у табл.3.1. Значення константи гасіння  $K_q$  перевищує максимальне для БСА  $K_{q,max} = 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , а сама константа немонотонно залежить від температури. Тому можна зробити висновок, що в системі БСА- $\text{CeO}_2$  має місце статичний механізм гасіння флуоресценції (111,127). Статичний механізм гасіння пов'язаний з утворенням кон'югатів БСА- $\text{CeO}_2$  та передачею енергії збудження від донора (триптофан) до акцептора (наночастинка) без випромінювання фотона.

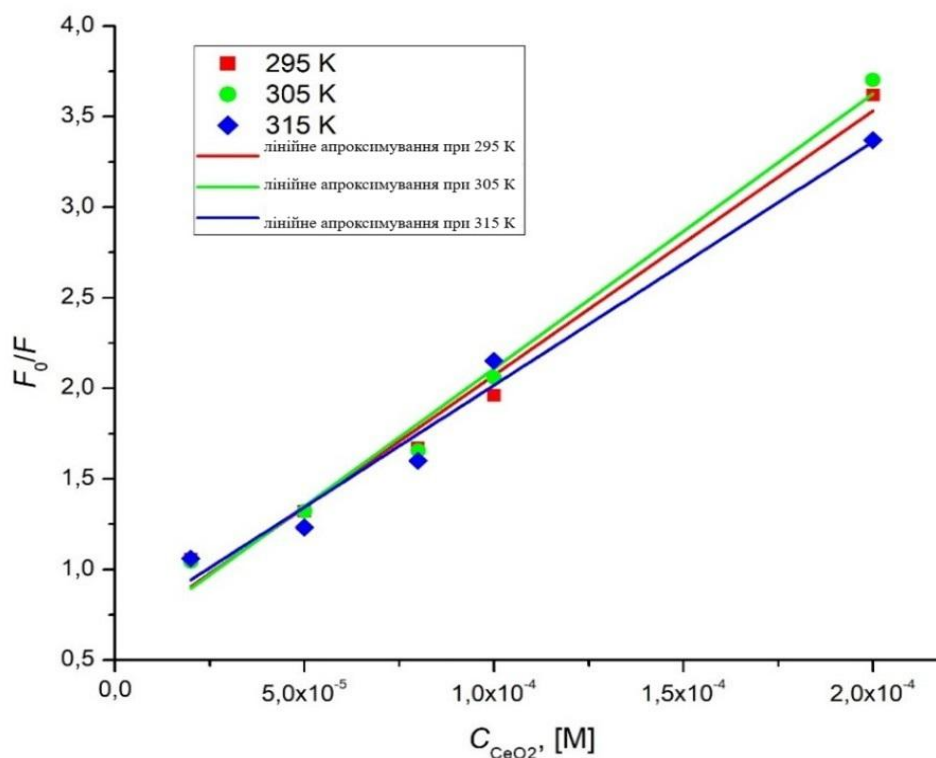


Рис.3.17. Залежності Штерна-Вольмера, отримані для експериментальних точок при  $T = 295 \text{ K}$  (■),  $305 \text{ K}$  (●),  $315 \text{ K}$  (◆). (Символи відповідають експериментальним результатам, суцільні лінії отримані з підгонки результатів лінійними залежностями Штерна – Вольмера).

Таблиця 3.1.

Константи гасіння Штерна – Вольмера для фізіологічних розчинів БСА- $\text{CeO}_2$  при різних температурах.

$T(\text{K})$	Параметри гасіння		
	Константа швидкості гасіння	Константи Штерна - Вольмера	$R$
	$K_q(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_{SV}(\text{M}^{-1})$	
295	$(1.46 \pm 0.099) \times 10^{12}$	$(1.46 \pm 0.099) \times 10^4$	0.9818
305	$(1.52 \pm 0.097) \times 10^{12}$	$(1.52 \pm 0.097) \times 10^4$	0.9838
315	$(1.34 \pm 0.1) \times 10^{12}$	$(1.34 \pm 0.1) \times 10^4$	0.9743

Даний механізм описується в рамках теорії Хілла наступним рівнянням :

$$\lg \frac{F_0}{F} = \lg K_A + n \lg [Q], \quad (3.5)$$

де  $K_A$  та  $n$  є відповідно константою та кількістю місць зв'язування молекули БСА та наночастинки  $\text{CeO}_2$  в утвореному кон'югаті.

На рис. 3.18 представлені експериментальні точки, отримані з спектрів емісії флуоресценції, та їхні лінійні апроксимації у відповідності до (5).

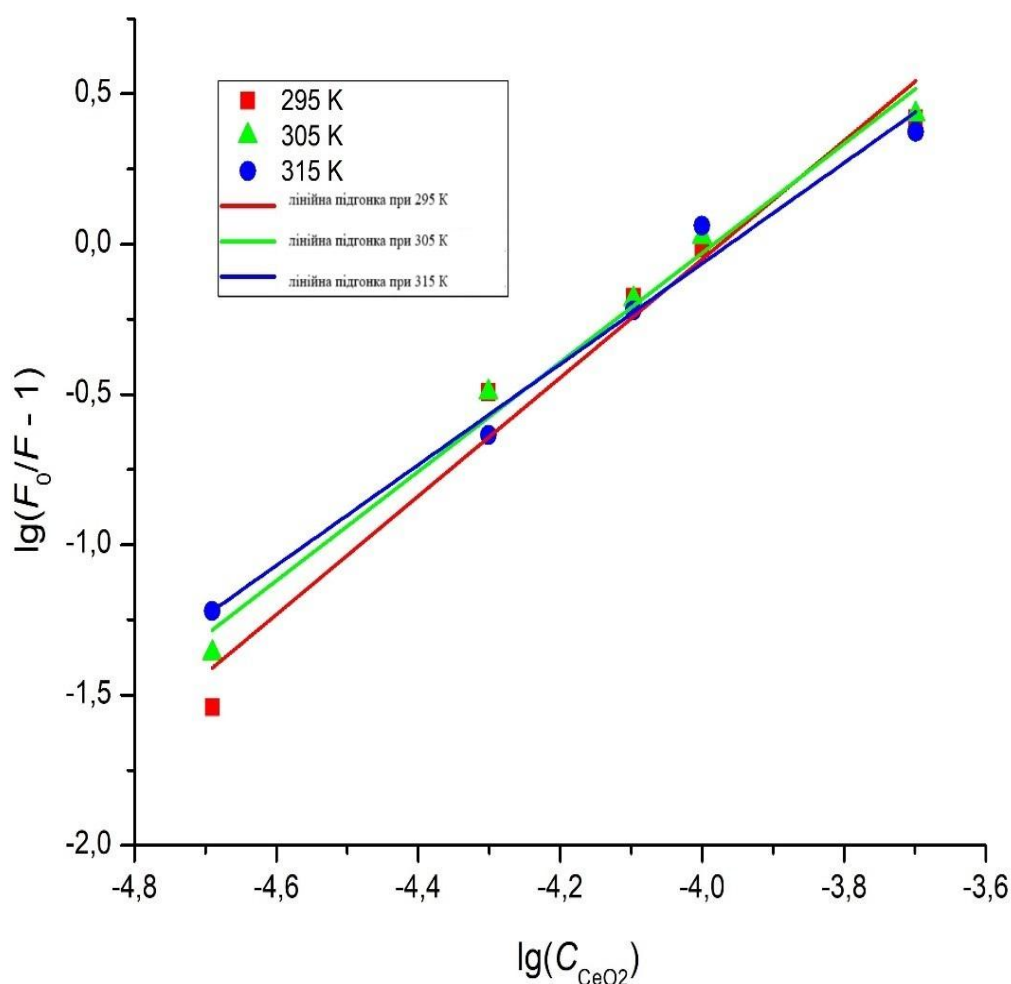


Рис. 3.18. Залежності Хілла, отримані для експериментальних точок при  $T = 295$  К (■),  $305$  К (●),  $315$  К (◆). (Символи відповідають експериментальним результатам, суцільні лінії отримані з підгонки при використанні лінійного рівняння Хілла).

Отримані в результаті апроксимації параметри зв'язування приведені у таб.3.2. Як видно, значення константи зв'язування, як і кількість місць зв'язування, спадає з ростом температури, що є характерним саме для статичного механізму гасіння.

Таблиця 3.2.

Константи зв'язування в кон'югатах БСА- $\text{CeO}_2$  при різних температурах.

Т(К)	Параметри зв'язування		
	$\lg K_A$	n	R
295	$7.83 \pm 0.8$	$1.97 \pm 0.19$	0.9626
305	$7.24 \pm 0.5$	$1.82 \pm 0.12$	0.9826
315	$6.63 \pm 0.51$	$1.67 \pm 0.12$	0.9788

Таким чином, з табл.3.2 видно, що кількість місць зв'язування  $n$  в комплексах БСА з наночастинками діоксиду церію приблизно дорівнює 2 та зменшується зі зростанням температури.

### 3.4. Термодинамічні характеристики розчинів БСА з наночастинками $\text{CeO}_2$

У відповідності до теорії ван Гоффа (111,127), значення константи зв'язування дозволяє отримати значення термодинамічних параметрів взаємодії молекули протеїну з наноцерієм в утвореному комплексі: ентальпію  $\Delta H$ , вільну енергію  $\Delta G$  та ентропію  $\Delta S$ , що в свою чергу

дозволить встановити переважаючий характер взаємодії. З рівняння ван Гоффа для заданої температури знайдемо зміну потенціалу Гіббса:

$$\Delta G = -RT \ln K_A, \quad (3.6)$$

де універсальна газова стала  $R = 8.314 \text{ J} \cdot \text{Моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ . Значення  $\Delta H$  знайдемо з лінійної апроксимації залежності константи зв'язування від температури розчину:

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}. \quad (3.7)$$

Отримавши величини  $\Delta G$  та  $\Delta H$ , можемо розрахувати зміну ентропії при різних температурах з використанням відомого співвідношення:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3.8)$$

Результати розрахунків термодинамічних характеристик БСА з наночастинками діоксиду церію приведені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4.

Термодинамічні характеристики розчинів БСА- $\text{CeO}_2$  при різних температурах

Термодинамічні параметри			
$T(\text{K})$	$\Delta G (\times 10^3 \text{ J/Моль})$	$\Delta S (\text{J} \cdot \text{Моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H (\times 10^3 \text{ J/Моль})$
2 95	-44.2±4.5	-211.63±0.03	
3 05	-42.25±2.9	-211.07±0.02	-106.63±3.04
3 15	-39.96±3.1	-211.64±0.03	

Значення термодинамічних параметрів свідчать про переважаючу роль сил ван-дер-Ваальса та водневих зв'язків в утворенні кон'югатів БСА- $\text{CeO}_2$ . Одержані значення енергії зв'язування та тип взаємодії добре узгоджуються з отриманими даними в результаті докінг-моделювання (117).

### Висновки до розділу 3

1. В роботі отримані спектри емісії флуоресценції та флуоресценції збудження фізіологічних розчинів бичачого сироваткового альбуміну та наночастинок діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  розміром 3 нм. Для спектрів емісії фізіологічних розчинів БСА спостерігається широкий пік при 348 нм, що зсувається у червону область спектру на 15 nm зі зростанням вмісту наночерію у розчині. Зростання концентрації наночастинок супроводжується монотонним зменшенням інтенсивності флуоресценції. За допомогою теорій Штерна-Вольмера та Хілла встановлено, що гасіння спектрів відбувається за рахунок статичного механізму з утворенням кон'югатів BSA- $\text{CeO}_2$  у розчинах. При цьому константа зв'язування  $K_A \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ , а число місць зв'язування  $n \cong 1.5 \div 2$ .
2. Встановлені термодинамічні характеристики ентальпії, ентропії та вільної енергії Гіббса при взаємодії макромолекули протеїну з наночастиною свідчать про переважаючі ван-дер-ваальсівські сили та водневі зв'язки у формуванні комплексів БСА- $\text{CeO}_2$ . Тип взаємодії та значення енергії зв'язування  $\Delta G \approx -40 \text{ кДж/моль}$  чудово узгоджуються з результатами моделювання молекулярного докінгу БСА з наночастиною діоксиду церію розміром 2.5-3 nm. В результаті моделювання встановлені моди зв'язування та найближче оточення амінокислотних залишків БСА навколо  $\text{CeO}_2$ .
3. З використанням теорії фьорстерівської нерадіаційної передачі енергії від донора (флуоресцентні амінокислотні залишки Trp-134 та Trp-213) до акцептора ( $\text{CeO}_2$ ) встановлена середня відстань від триптофану до наночастинок, що дорівнює  $r \cong 6 \text{ nm}$ . Одержане значення дещо перевищує знайдене в результаті моделювання, однак підтверджує виникнення кон'югатів БСА- $\text{CeO}_2$  та відповідний статичний механізм гасіння флуоресценції.

## РОЗДІЛ 4

### КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ЛСА З КВЕРЦЕТИНОМ ТА КУРКУМІНОМ

#### 4.1. Сайти зв'язування в розчинах у водних розчинах ЛСА- кверцетин та ЛСА-куркумін

Складна поліфенольна молекулярна структура кверцетину може сприяти різним механізмам його взаємодії з ЛСА. До будови кверцетину входять два ароматичні кільця А і В, об'єднані між собою пірановим циклом (67). В цій молекулі можна виділити кілька важливих структурних елементів, що виступають активними центрами. До них можна віднести подвійний зв'язок між атомами карбону 2 і 3, спільно з карбонільною групою С=О з атомом С в положенні 4, які сприяють де локалізації від кільця В. Крім того, мають місце дві гідроксильні групи ОН в положеннях 3 і 5 спільно з карбонільною групою, а також дві гідроксильні групи в положеннях 3' і 4'.

Кверцетин проявляє антирадикальну активність по відношенню до різного типу вільних радикалів кисню, що накопичується в організмі за рахунок передачі їм електронів або атома гідрогену. За антирадикальну активність цього препарату відповідає дисоціація гідроксильної групи фенолу, яка переходить в свою чергу аніону форму в залежності від величини рН середовища. Зростом рН антирадикальна активність кверцетину підвищується. Таким чином, наявність в структурі кверцетину трьох активних центрів, як відмічалось, супроводжується можливістю взаємодії з ЛСА за рахунок гідрофобних, електростатичних і водневих зв'язків, наявність яких передбачає кількість сайтів зв'язування. Крім того, молекула кверцетину може перебувати в кількох s-цис і s-транс ізоморфних формах, що також може впливати на процеси гетероасоціації ЛСА з кверцетином.

На рис.4.1 показано молекулярну структуру (128), оптимізовану геометрію молекули та розподіл зарядів на атомах молекули кверцетину.

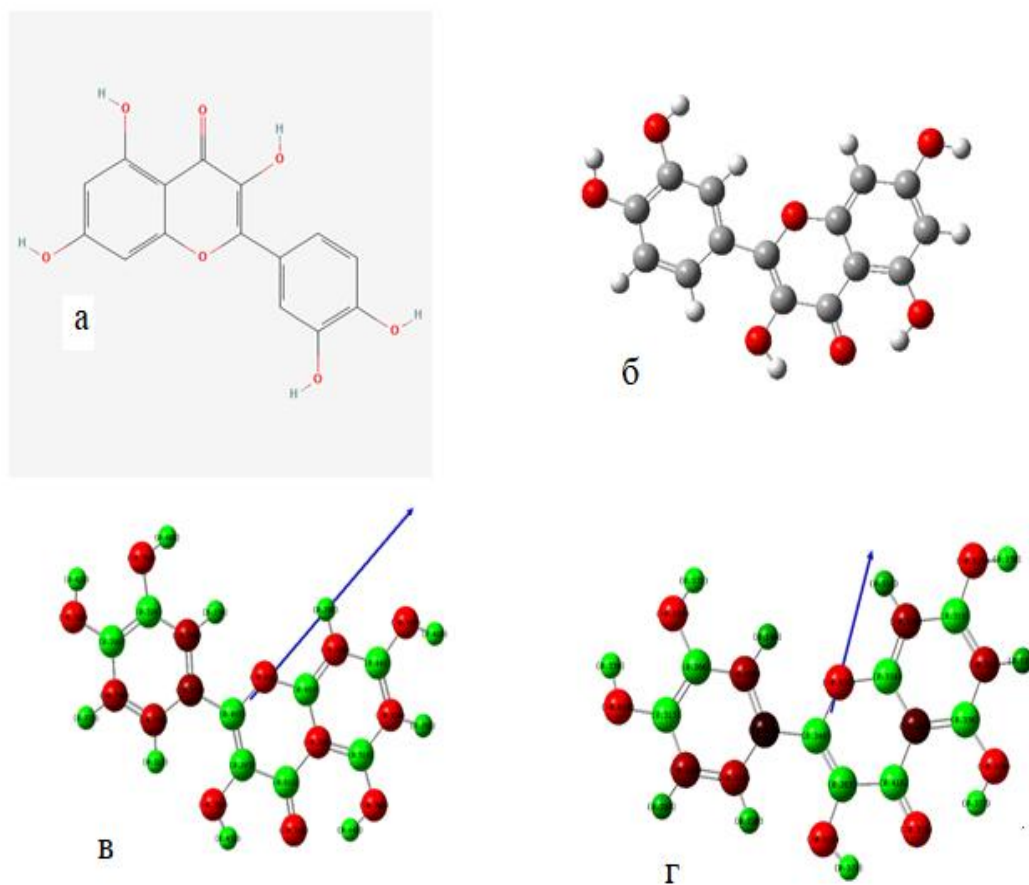


Рис. 4.1. Молекулярна структура (а), оптимізація геометрії (б) та розподіл зарядів на атомах, розрахований методом HF (в) та методом DFT (г) кверцетину (білий колір - атом Водню (H), сірий колір - атом Вуглецю (C), червоний колір - атом Кисню (O)); зелений колір - додатній заряд атома, червоний колір - від'ємний заряд атома, цифри вказують на величину заряду).

З розрахованого розподілу зарядів видно, що молекула куркуміну є полярною, значення величин зарядів на обох конформерах майже однакові, але в результаті вигнутості майже на  $90^\circ$  куркуміну (б) біля атомів кисню в

центрі ланцюга. Значення дипольного моменту у лінійній молекулі є більшим і складає 7Д, ніж у вигнутій - 4,7Д.

Розглянемо, як відобразиться дана взаємодія для обох конформерів на електронній структурі комплексів. Рівні НОМО, LUMO триптофану, рис.4.2, 1, локалізовані на індольному фрагменті, енергетична щілина між якими забезпечує поглинання, максимум якого зсунутий в синю область відносно куркуміну. У випадку лінійної молекули куркуміну, рис. 4.2, 2, електронна густина для НОМО, LUMO делокалізована по всій довжині хромофору, в той час як несиметричне вигинання іншого конформеру, рис. 4.2, 3, в середині ланцюга приводить до розриву електронної густини так, що НОМО локалізоване на одній половині хромофору, а LUMO на іншій.

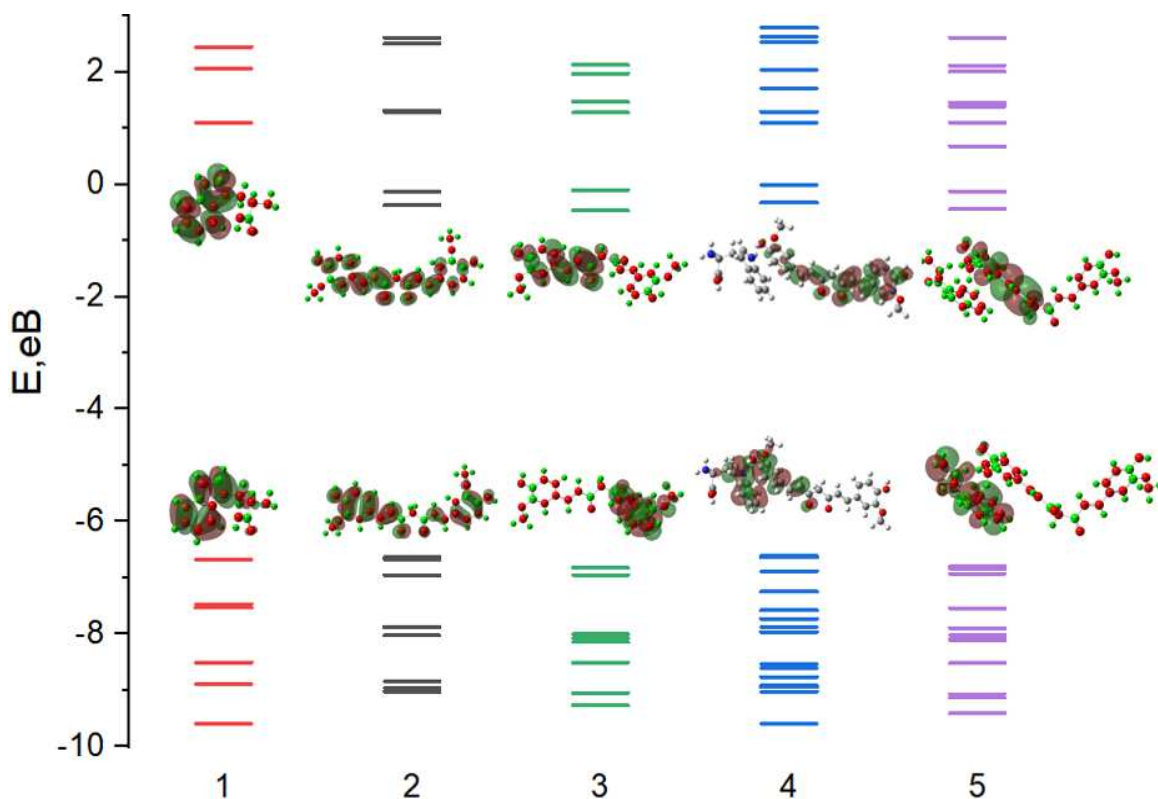


Рис. 4.2. Розподіл електронних рівнів в околі енергетичної щілини НОМО-LUMO і форми молекулярних орбіталей для молекули триптофану (1), лінійної форми куркуміну (2), вигнутого куркуміну (2), комплексу лінійний куркумін-триптофан (4) та комплексу вигнутий куркумін-триптофан (5).

При формуванні комплексу триптофану з лінійним конформером внаслідок взаємодії між ними, електронна густина НОМО одночасно локалізована на половині хромофору конформеру та індолі. Ця орбіталь значно зміщується за енергією внаслідок зменшення області  $\pi$ -спряження. LUMO локалізована на половині хромофору лінійного куркуміну. Ця ситуація відрізняється від тієї, яка реалізується у випадку вигнутої молекули, де НОМО локалізується на триптофані, а LUMO на половині хромофору. У таблиці 4.1 наведені значення енергії рівнів НОМО та LUMO.

Таблиця 4.1.

Розподіл енергетичних рівнів для молекул триптофану, куркуміну та їх комплексу

	Триптофан	Куркумін лінійний	Куркумін вигнутий	Комплекс лінійний	Комплекс вигнутий
LUMO, eV	1,094	-0,367	-0,457	-0,322	-0,436
НОМО, eV	-6,674	-6,639	-6,823	-6,227	-6,792
Енергетична щільність, eV	7,768	6,272	6,366	5,905	6,356
Дипольний момент, D	4,887	6,960	4,654	10,958	2,778
Енергія, H	-682.022	-1255.764	-1255.809	-1937.865	-1863.288

Отримані дані свідчать, що конформаційні стани впливають на електронну будову комплексів і приводять до суттєвої трансформації молекулярних орбіталей у (126,129–131).

#### 4.2. Параметри зв'язування у водних розчинах ЛСА-кверцетин

Молекула кверцетину включає до свого складу дві кільцеві хромофорні групи. Один з хромофорних центрів відповідає дигідроксилфенольному кільцю В. Поглинання світла цим ароматичним кільцем приводить до появи смуги поблизу видимого діапазону з

максимумом біля 370 нм. Інколи цю частину кверцетину, як і відповідну смугу позначають I. Друга частина молекули включає хромофорний центр, що складається з кілець А і С та бічних груп (II), поглинання світла на якому відбувається в УФ діапазоні у вигляді менш інтенсивної смуги (II) з максимумом біля 270 нм. При цьому смуга поглинання I є чутливою до хімічної взаємодії кверцетину та умов оточуючого середовища, включаючи значення рН (63,64,132).

На рис.4.3 показано спектр оптичної густини для розчину у воді ЛСА у відсутності та присутності розчинів у воді з DMSO кверцетину за різних концентрацій в межах від  $0,25$  до  $4 \cdot 10^{-6}$  М. Концентрація ЛСА в розчинах зберігається постійною і рівною  $C_{\text{ЛСА}} = 2 \cdot 10^{-6}$  М.

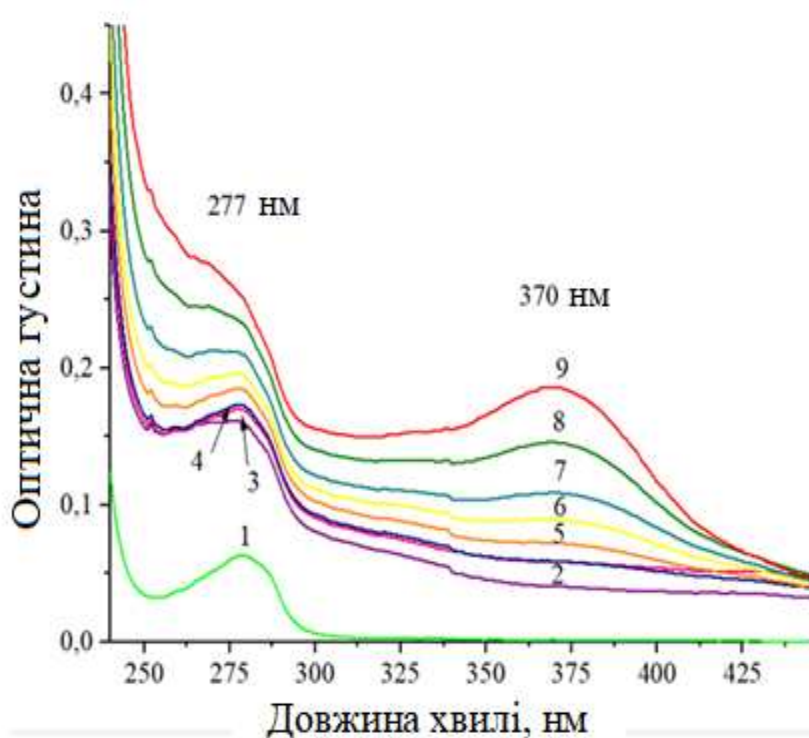
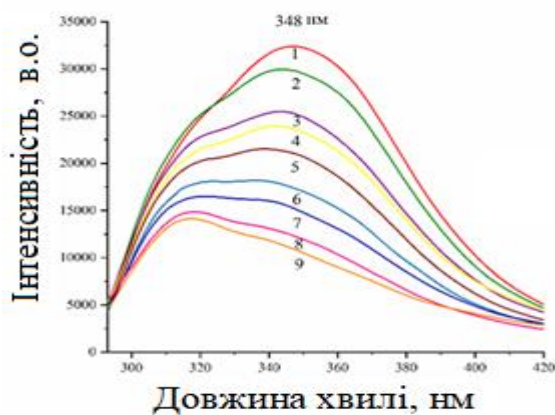


Рис.4.3. Спектри оптичного поглинання розчину у воді ЛСА з постійною концентрацією  $C_{\text{ЛСА}} = 2 \cdot 10^{-6}$  М (1) та після додавання розчинів з DMSO кверцетину з концентраціями  $C_{\text{Кверцетин}} = 0,25$  (2), 0,5 (3), 0,75 (4), 1.0 (5), 1,5 (6), 2.0 (7), 3.0 (8),  $4.0 \cdot 10^{-6}$  М (9) ( $T=293$  К, рН 5.5).

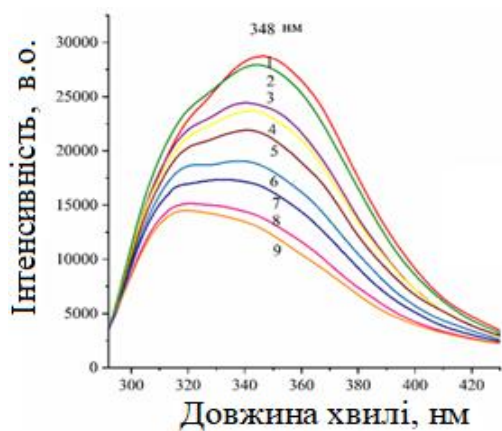
Видно, що в спектрі оптичної густини для розчину у воді ЛСА за даної концентрації ( $2 \cdot 10^{-6}$  М) з'являється смуга з максимумом біля 277 нм, характерна для вказаного білка. При титруванні розчинів з DMSO кверцетину має місце збільшення оптичної густини для обох смуг I (370 нм) і II (277 нм), які властиві лікарському препарату. При цьому за високих концентрацій кверцетин смуга II розмивається, а смуга I стає більш вираженою. Перебудова смуги II свідчить про виникнення в розчині ЛСА-кверцетин комплексів, формування яких відбувається за різними специфічними механізмами.

Для визначення параметрів зв'язування в гетеросоціатах ЛСА-кверцетин був використаний метод стаціонарної флуоресценції (ФЛ) для розчинів у воді ЛСА-кверцетин при збільшенні вмісту молекул лікарського препарату із метою встановлення характеру гасіння ФЛ.

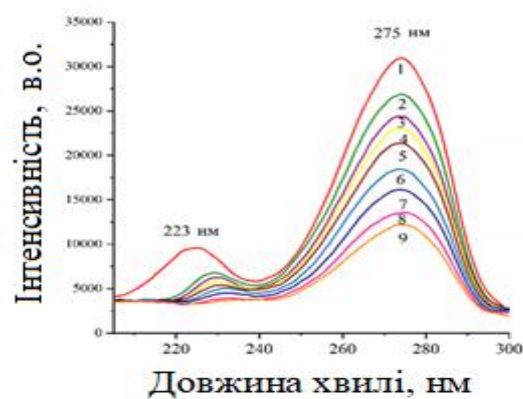
На рис.4.4 показано спектри емісії та збудження флуоресценції для розчинів у воді ЛСА при додаванні розчинів у воді з DMSO кверцетину за різних температур. З підвищенням температури інтенсивність ФЛ зменшується. Водночас, характер її гасіння відрізняється, з підвищенням вмісту кверцетину також змінюється профіль смуг. Аналогічно, спостерігається зменшення інтенсивності в спектрі збудження. При цьому положення максимуму смуги біля 275 нм, що відповідає ароматичним залишкам амінокислот Trp 214 і Tyr зберігається смуга з максимумом біля 223 нм, що пов'язана з пептидними зв'язками не лише зменшується, а також зміщується в червону область. Гасіння ФЛ розчину ЛСА з підвищенням вмісту кверцетину, зміна профілей смуг емісії ФЛ, а також зміщення смуги збудження ФЛ свідчить як про утворення комплексів ЛСА-кверцетину, так і про перебудову вторинної структури макромолекули протеїну при локальній зміні її середовища внаслідок інкапсулювання молекули кверцетину.



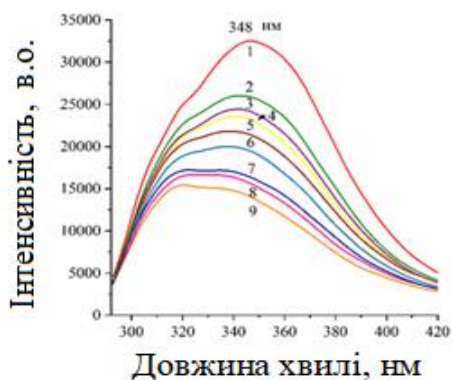
а



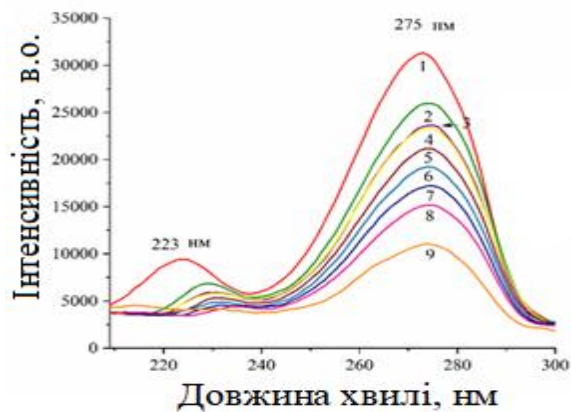
б



в



г



д

е

Рис.4.4. Спектри емісії (а,в,д) та збудження (б,г,е) ФЛ розчинів у воді ЛСА з постійною концентрацією  $C_{\text{ЛСА}} = 2 \cdot 10^{-6}$  М (1) та після додавання розчинів у воді з DMSO кверцетину з різними концентраціями  $C_{\text{Кверцетин}} = 0,25$  (2), 0,5 (3), 0,75 (4), 1.0 (5), 1,5 (6), 2.0 (7), 3.0 (8),  $4.0 \cdot 10^{-6}$  М (9) за температури 293 К (а,б), 303 К (в,г), 313 К (д,е) ( $\lambda_{\text{зб}}=275$  нм,  $\lambda_{\text{ем}}=348$  нм, рН 5.5).

Важливими параметрами молекулярних комплексів в тому числі ЛСА з одним з лігандів кверцетином, є константи зв'язування  $k_A$  і число місць зв'язування в ЛСА для кверцетину в можливих сайтах зв'язування  $n$ . При цьому залежність константи зв'язування  $K_A$  від температури дозволяє визначити пріоритетні внески від змін ентальпії та ентропії у зміну вільної енергії Гіббса і таким чином визначити природу зв'язування в розглянутих комплексах. Для визначення величин  $K_A$  і  $n$  необхідно оцінити природу гасіння флуоресценції (130,133)

Для встановлення типу гасіння можна скористатися відомими рівняннями Штерна-Фольмера, яке для динамічного гасіння характеризується лінійною залежністю величини гасіння флуорофора від концентрації гасника.

Можна очікувати, що у випадку, коли експериментальні результати зміни гасіння ФЛ  $F_0/F$  від [Кверцетину] описується лінійною залежністю, відбувається зіткнення молекул за час  $\tau_0$ , яке приводить до динамічного гасіння. Константи гасіння визначається з нахилу прямих Штерна-Вольмера. Якщо лінійна залежність не описує експериментальні дані гасіння, а має місце позитивне відхилення від прямої, то в таких системах має місце статичне гасіння, що відбувається внаслідок утворення комплексів при взаємодії молекул в основному стані.

Разом з тим, лінійна залежність  $F_0/F$  від [Кверцетину] може бути не зумовлена динамічними процесами комплексоутворення. Очевидно, що у випадку зіткнень між молекулами, імовірність яких визначається дифузійною молекулами, константи гасіння за більш високих температур мають бути більшими. Крім того, відомо, що у випадку значення  $K_q$ , яке перевищує  $K_{q,max} = 2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , комплексоутворення реалізується за рахунок статичних механізмів гетеросоціації.

На рис.4.5. наведено експериментальні результати  $F_0/F$  для різних концентрацій кверцетину для водного розчину ЛСА- кверцетин при різних температурах, а також лінійні залежності Штерна-Вольмера у вигляді прямих ліній, що відповідають різним температурам. Значення  $K_{SV}$  і  $K_q$  при різних температурах, отримані із залежностей Штерна-Вольмера наведено в таблиці 4.2. Видно, що з підвищенням температури  $K_{SV}$  і  $K_q$  падає, а величина  $K_q$  на кілька порядків перевищує її максимальне значення.

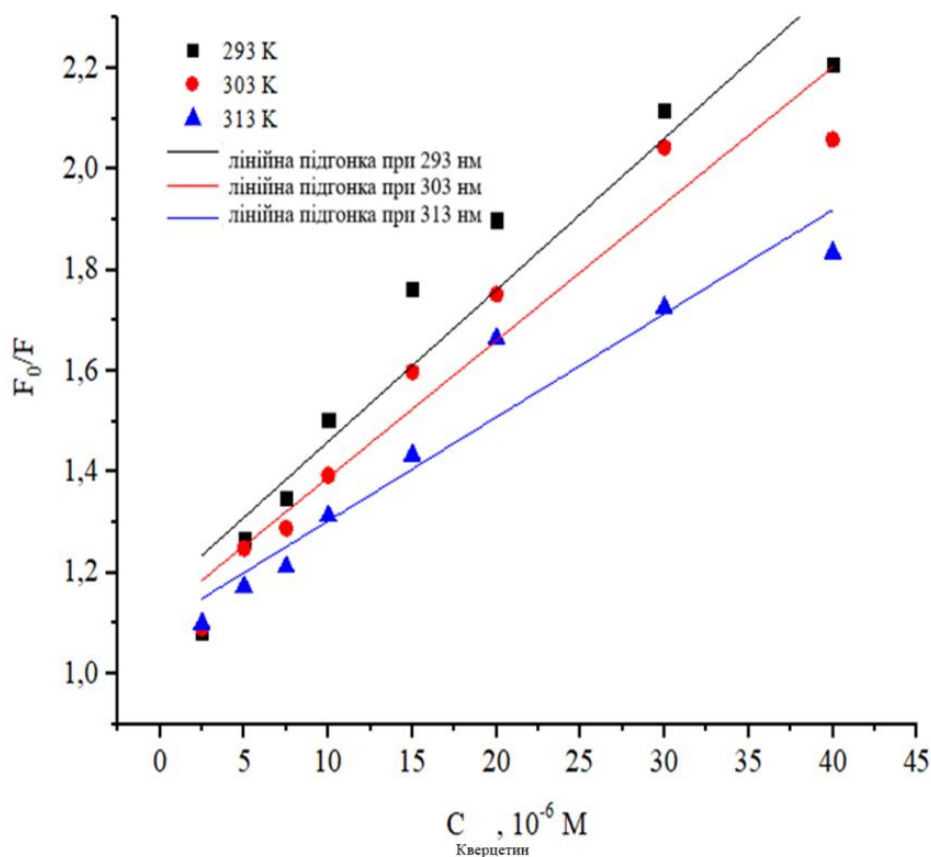


Рис.4.5 Залежності Штерна-Вольмера для розчинів у воді ЛСА- кверцетин при температурах 293 К (1), 303 К (2), 313 К (3) (символи належать експериментальним результатам, суцільні лінії відповідають підгонці цих результатів з використанням рівняння Штерна-Вольмера).

Отримані результати вказують, що в системі ЛСА-кверцетин утворення комплексів між молекулами відбувається в основному стані, тобто внаслідок статичних процесів. Наведені результати добре узгоджується з подібними дослідженнями розчинів у воді ЛСА-кверцетин при рН 7,4 (1,134).

Таблиця 4.2.

Значення  $K_{SV}$  і  $K_q$  для розчинів у воді ЛСА-кверцетин при різних температурах

T(K)	Параметри гасіння	
	Константа швидкості гасіння $K_q$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Константа Штерна-Вольмера $K_{SV}$ ( $M^{-1}$ )
293	$1,15 \times 10^{12}$	$1,15 \times 10^4$
303	$1,11 \times 10^{12}$	$1,11 \times 10^4$
313	$1,09 \times 10^{12}$	$1,09 \times 10^4$

У випадку статичного гасіння ФЛ використовується кілька модифікованих співвідношень Штерна-Вольмера для розрахунку параметрів зв'язування  $K_A$  і  $n$ . Серед них широко використовуються залежність Хілла.

Залежності Хілла для розчинів у воді ЛСА-кверцетин при різних температурах представлені на рис.4.6.

Видно, що експериментальні результати добре описується лінійними залежностями Хілла в координатній системі подвійних логарифмів. Водночас, в порівнянні із залежністю Штерна-Вольмера нахили прямих мають протилежний вигляд з підвищенням температури. Це свідчить, що

величини відсікання на осі ординат змінюється і, як наслідок, значення  $K_A$  зменшується з ростом температури.

Величини  $K_A$  і  $n$ , що забезпечують добре узгодження експериментальних даних з лінійними залежностями Хілла при різних температурах, наведено в таблиці 4.3.

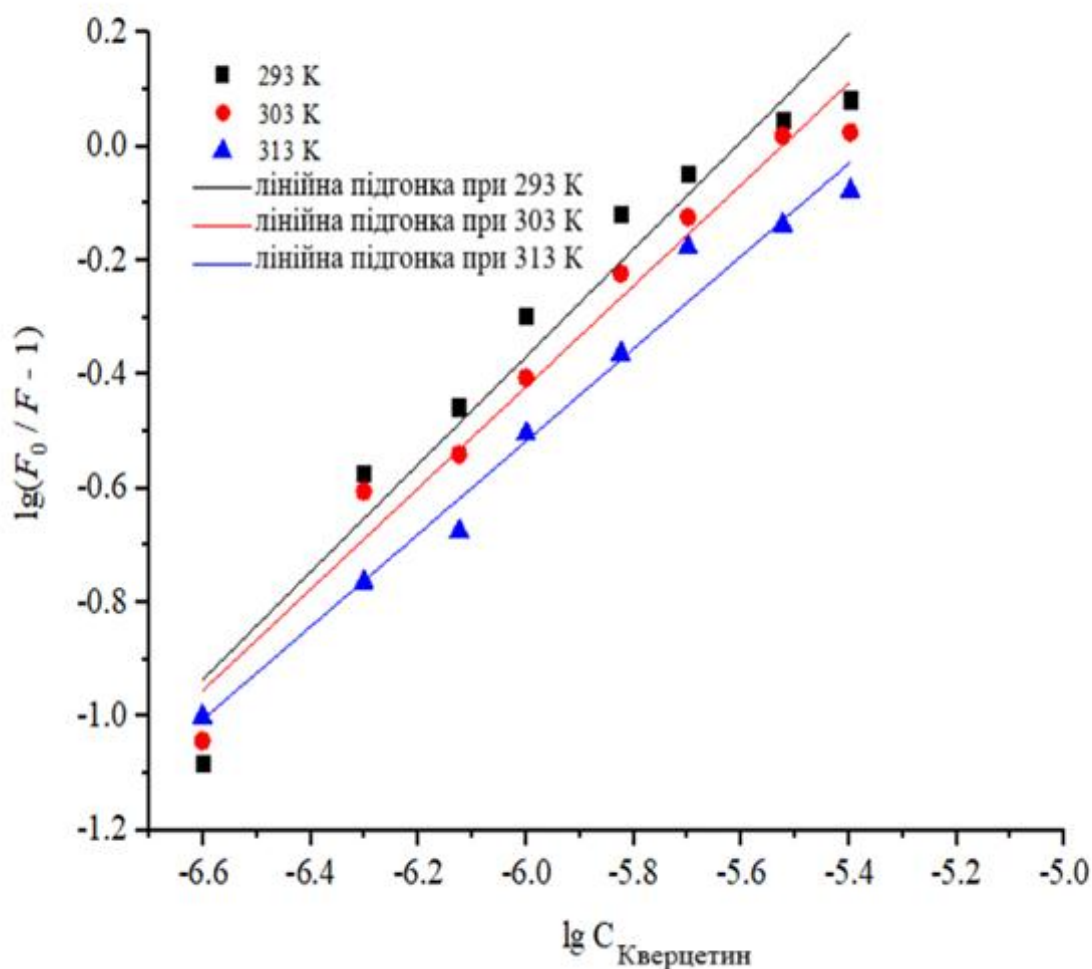


Рис.4.6. Залежності Хілла для розчинів ЛСА-кверцетин при температурах 293 К (1), 303 К (2), 313 К (3) (символи належать експериментальним результатам, прямі лінії відповідають підгонці цих результатів з використанням рівняння Хілла).

Характерною особливістю отриманих значень є близькість  $n$  до 1, що дозволяє вважати, що до кожної молекули білка в одному із сайтів

можливого зв'язування під'єднується одна молекула лікарського препарату. Другою особливістю є падіння константи зв'язування  $K_A$  з температурою, що зумовлено статистичним процесами комплексоутворення.

Таблиця 4.3.

Значення  $\lg K_A$  і  $n$  для розчинів у воді ЛСА- кверцетин при різних температурах, отримані із залежностей Хілла.

$T$ (К)	Параметри зв'язування	
	$\lg K_A$	$n$
293	5,29	0,94
303	4,9	0,88
313	4,35	0,81

Подібні значення  $K_A$  і  $n$  отримані для систем ЛСА- кверцетин в інших роботах з рН 7,4. Так, при температурах 292 К, 298 К, 304 К, 310 К  $K_A$  отримані рівними  $4,17 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ,  $3,14 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ,  $1,35 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ,  $0,69 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ , відповідно (134). До речі,  $K_A$  виявилось близькими для розчинів БСА-кверцетин ( $\log K_A=5.0$ ,  $n=0,98$ ) і ЛСА- кверцетин ( $\log K_A=5.44$ ,  $n=1,03$ ) (1). Водночас, при зв'язуванні кверцетину з DNA (64) константа зв'язування зростає до  $2,99 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$  ( $n=1,40$ ), а комплексоутворення з флаваноїдом, похідним від кверцетину - рутіном - сильно зменшується до  $4,14 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}$  ( $n=0,71$ ). Високі значення  $K_A$  зберігаються при зв'язуванні кверцетину із сполуками DNA з аргеніном, аспарагіном, фенілаланіном. З підвищенням температури в розчинах кверцетину з DNA в сполуці з амінокислотами величина  $K_A$  зменшується, тобто також зберігається статичний процес комплексоутворення.

При використанні виручених у воді з ЛСА інших відомих флаваноїдів, наприклад, куркуміну крива залежності Штерна-Вольмера

характеризується позитивним відхиленням, тобто зв'язування відбувається за статичним механізмом. Разом з тим, в подвійній логарифмічній шкалі підгонка експериментальних результатів узгоджується з лінійною залежністю Хілла. При цьому значення  $K_{SV} = 0,35 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $n = 1.402$ ,  $K_A = 1,419 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  (135). Видно, що у випадку зв'язування ЛСА з куркуміном величина  $K_A$  зменшується в порівнянні з комплексами ЛСА-кверцетин.

Зв'язування у буферному розчині (з рН 7,4) ЛСА з одним із широко розповсюджених флавоноїдів як лікарський препаратом, гесперетином, при  $n = 5$  відбувається з  $K_A = 8,11 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  (136). Необхідно відмітити, що флавоноїди кверцетин і рутин впливають на комплексоутворення ЛСА з іншими біоструктурами наприклад, сорафеніб (Sor). Так, для системи ЛСА - Sor  $K_{SV} = 2,55 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  при  $T=298 \text{ K}$ , яка падає з ростом температури, а  $K_A = 1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  ( $n = 0,9617$ ), з ростом температури  $K_A$  зменшується до  $7,03 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  при  $303 \text{ K}$  і  $1,47 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  при  $307 \text{ K}$ , що вказує на взаємодію між згаданими молекулами в основному стані з утворенням комплексів у випадку потрійних систем (ЛСА-кверцетин)-sorafenib  $K_{SV}$  зменшується при  $T=298 \text{ K}$  температурі до  $2,36 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ , а  $K_A$  до  $0,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  (137).

Таким чином залежності від відмінностей в молекулярній структурі різних флавоноїдів з ЛСА спостерігається зміна константи зв'язування, що свідчить про різні механізми зв'язування при збереженні статичного типу утворення комплексів. Водночас, мають місце зміни величин  $K_A$  при комплексоутворенні флавоноїдів з різними біоструктурами, в тому числі альбумінами і DNA. Перехід від бінарних систем з ЛСА до потрійних за участі флавоноїдів також впливає на константи зв'язування при збереженні числа місць зв'язування в альбумінах (130).

Відомо, що процеси комплексоутворення супроводжується зміною вільної енергії, яка визначається зміною вільної енергії, енергії, яка визначається константою зв'язування і температурою і, як наслідок, змінами ентальпії та ентропії.

Аналогічні дослідження були проведені також для розчинів ЛСА з куркуміном. На рис. 4.7 показано спектри оптичного поглинання ЛСА у водному розчині за постійною концентрацією у відсутності куркуміну та в його присутності після розчинення в DMSO з різною концентрацією при збільшенні вмісту лікарського препарату від  $0,25 \cdot 10^{-6}$  М до  $4 \cdot 10^{-6}$  М.

Спектр оптичної густини молекул лікарського препарату куркуміну характеризується присутністю 2 смуг поглинання. Перша з них, яка менш інтенсивна, має максимум біля 352 нм, а друга - більш інтенсивна - описується піком з максимум біля 430 нм.

Ці смуги пов'язують зі спектральними переходами в фенольних кільцях молекули, відповідно. При титрування розчинів з молекулами куркуміну розчину у воді ЛСА обидві смуги оптичного поглинання куркуміну зберігаються і виникає додаткова, більш слабка смуга, з максимумом біля 277 нм. Зі зростанням концентрації молекул куркуміну оптична густина, що відповідає поглинанню ЛСА, зростає і зміщується в червону область, що вказує на комплексоутворення з виникненням гетероасоціатів ЛСА-куркумін.

Спектр оптичної густини молекул лікарського препарату куркуміну характеризується присутністю 2 смуг поглинання. Перша з них, яка менш інтенсивна, має максимум біля 352 нм, а друга - більш інтенсивна - описується піком з максимум біля 430 нм. Ці смуги пов'язують зі спектральними переходами в фенольних кільцях молекули, відповідно.

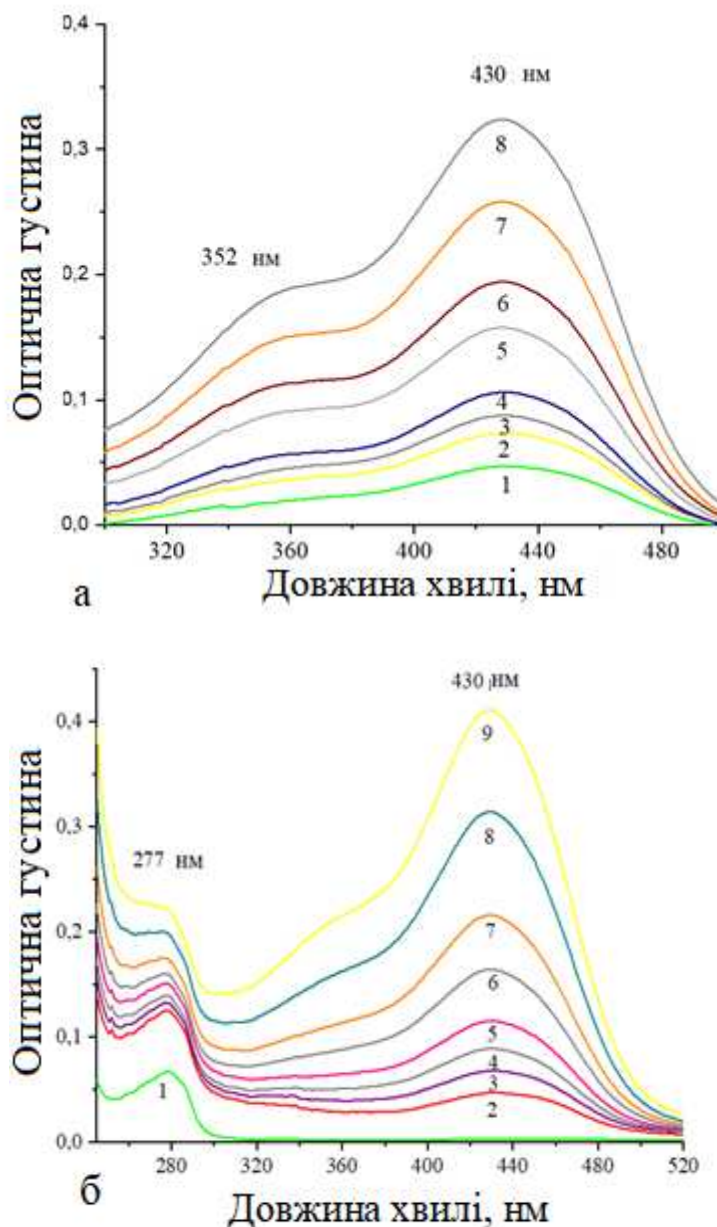


Рис.4.7. Спектр оптичного поглинання куркуміну у водних розчинах з DMSO концентраціями  $2.5(1), 5.0(2), 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ М}(3), 1.0(4), 1.5(5), 2.0(6), 3.0(7), 4.0 \cdot 10^{-6} \text{ М}(8)$  (а) та розчинів у воді ЛСА з постійною концентрацією ( $2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ ) у відсутності (1) та в присутності куркуміну, розчиненого у воді з DMSO з концентраціями  $2.5(2), 5.0(3), 7.5 \cdot 10^{-7} \text{ М}(4), 1.0(5), 1.5(6), 2.0(7), 3.0(8), 0 \cdot 10^{-6} \text{ М}(9)$  (б) ( $T=293 \text{ К}, \text{pH } 5.5$ ).

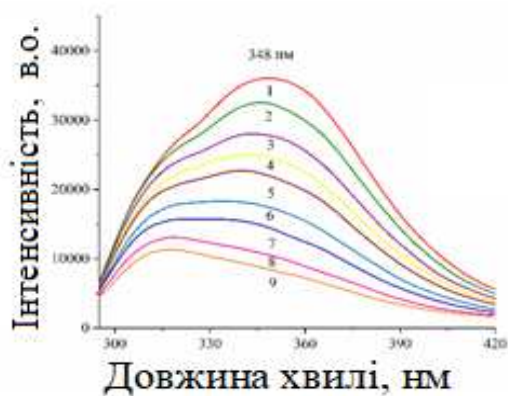
При титруванні розчинів з молекулами куркуміну розчину у воді ЛСА обидві смуги оптичного поглинання куркуміну зберігаються і виникає додаткова, більш слабка смуга, з максимумом біля 277 нм. Зі зростанням концентрації молекул куркуміну оптична густина, що відповідає поглинанню ЛСА, зростає і зміщується в червону область, що вказує на комплексоутворення з виникненням гетероасоціатів ЛСА-Куркумін.

Утворення гетероасоціатів також підтверджується вивченням поведінки спектрів емісії і збудження флуоресценції в розчинах ЛСА-Куркумін при зростанні концентрації лікарського препарату.

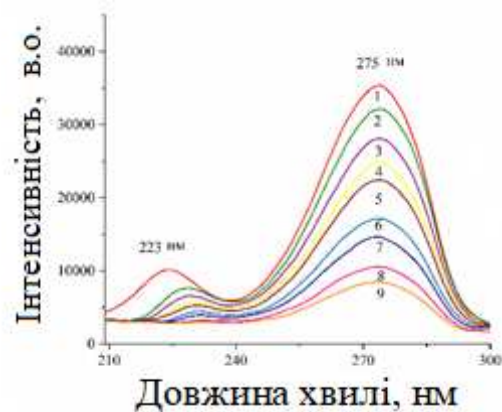
На рис. 4.8 показано спектра емісії і збудження флуоресценції для розчинів у воді ЛСА-куркумін при постійній концентрації ЛСА у відсутності та присутності куркуміну при зростанні вмісту молекули.

Зі спектрів емісії флуоресценції видно, що для всіх трьох температур підвищення в розчині вмісту молекул куркуміну приводить до гасіння флуоресценції. Водночас, зі зростанням температури інтенсивність смуг в максимумах падає при збереженні їх положення біля 348 нм. Аналогічно, відбувається падіння внеску у смугі флуоресценції від смуги збудження з максимумом біля 275 нм і 223 нм, характерними для ЛСА. Разом з тим, при збільшенні вмісту ЛСА положення максимума біля 275 нм залишається незмінним, а максимум смуги збудження біля 223 нм зміщується в червону область. Очевидно, що обидва фактори зумовлені утворенням в розчинах комплексів ЛСА-куркумін (131,138)

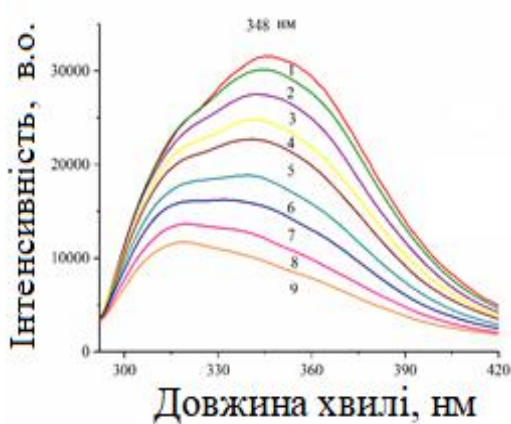
На рис.4.9 наведено залежності Штерна - Вольмера для розчинів у воді ЛСА-Куркумін за різних температур. Видно, що нахил прямих найменший для найвищої з вибраних температур (313 К), що не узгоджується з механізм динамічного гасіння.



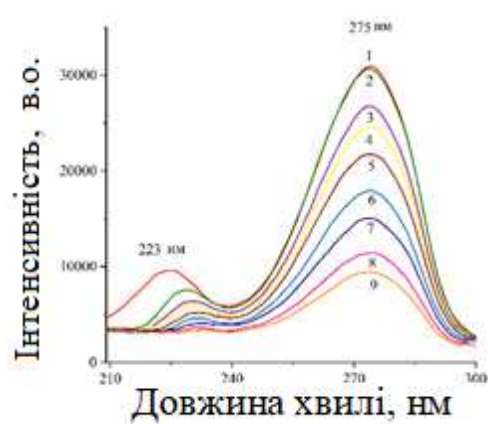
а



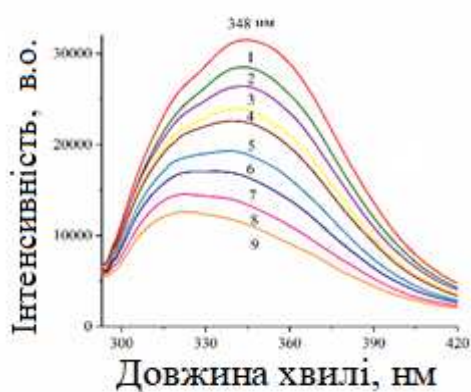
б



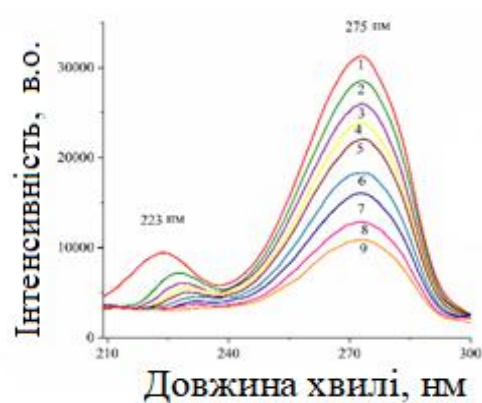
в



г



д



е

Рис.4.8. Спектри емісії флуоресценції (а,в,д) та флуоресценції збудження (б,г,е) ЛСА з куркуміном у водних розчинах при концентрації альбуміну  $C_{\text{БСА}} = 2 \cdot 10^{-6}$  М і концентрації куркуміну  $C_{\text{Куркумін}} = 0(1), 2.5(2), 5(3), 7.5 \cdot 10^{-7}(4), 1(5), 1.5(6), 2(7), 3(8), 4 \cdot 10^{-6}(9)$  М ( $T = 293$  (а,б),  $303$  (в,г),  $313$  (д,е) К,  $\text{pH } 5.5, \lambda_{\text{зб}} = 275$  нм,  $\lambda_{\text{ем}} = 348$  нм).

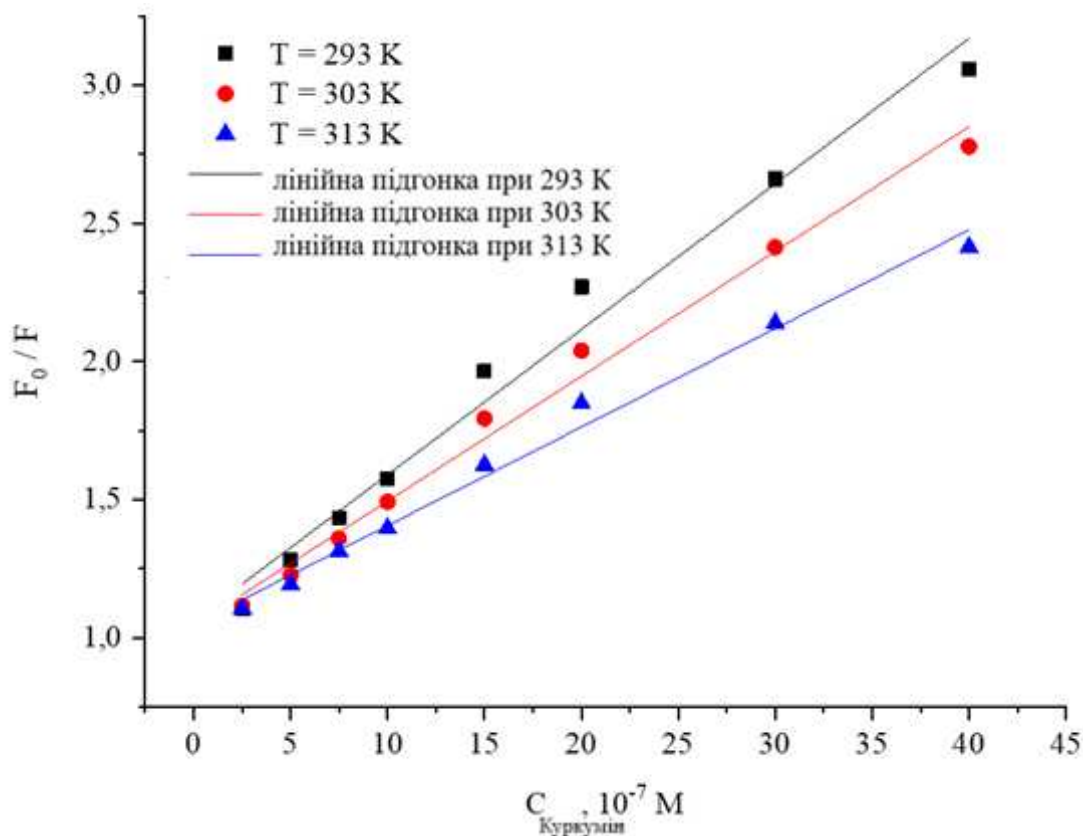


Рис. 4.9. Залежності Штерна - Вольмера для розчинів у воді ЛСА-Куркумін за температури 293 К (■), 303 К (●), 313 К (▲). (Символи відповідають експериментальним результатам, суцільні лінії отримані з підгонки результатів лінійними залежностями Штерна - Вольмера).

Очевидно, що величини для отриманих результатів будуть зменшуватися з ростом температури, що видно з таблиці 4.5.

Крім зменшення величин з ростом температури можна помітити, що, як витікає з моделі динамічного гасіння, відповідає значенню. Таким чином, для розчинів ЛСА - куркумін температурна залежність та перевищення максимально можливого значення вказують, що гасіння флуоресценції реалізується за іншим механізмом, а саме у відповідності до механізму статичного гасіння.

Таблиця 4.5.

Значення константи Штерна - Вольмера для водних розчинів ЛСА-Куркумін за різних температур.

T(K)	Параметри гасіння	
	Константа швидкості гасіння $K_q$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Константи Штерна - Вольмера $K_{SV}$ (M <sup>-1</sup> )
29 3	$5,27 * 10^{13}$	$5,27 * 10^5$
30 3	$4,52 * 10^{13}$	$4,52 * 10^5$
31 3	$3,57 * 10^{13}$	$3,57 * 10^5$

Вказаний механізм передбачає, що комплекси в розглянутій системі утворюються не в результаті зіткнення молекул у збудженому стані, а як результат їх формування в основному стані у вигляді стабільних гетероасоціатів. Гасіння флуоресценції такими стабільними комплексами вимагає іншого опису, застосовуючи різні модифіковані рівняння Штерна -Фольмера.

Це рівняння для статичного гасіння встановлює зв'язок кількість місць зв'язаного ліганда на 1 моль білка  $r$ , молярна концентрація вільного ліганда  $D_f$  з числом місця зв'язування для кожного класу сайтів  $n$  та з рівноважною константою зв'язування  $K_A$  у вигляді рівняння Скетчарда:

$$\frac{r}{D_f} = nK_A - r \cdot K_A \quad (4.1)$$

Рівноважна константа зв'язування для випадку статичного гасіння інколи

визначається з модифікованого рівняння Штерна-Вольмера у вигляді:

$$\frac{F_0}{F_0-F} = \frac{1}{f \cdot K_A} \cdot \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{f} \quad (4.2)$$

де  $f$  – доля доступної інтенсивності ФЛ. Для  $n=1$  це рівняння спрощується до вигляду:

$$\frac{F_0}{F_0-F} = 1 + \frac{1}{K_A} \cdot \frac{1}{[Q]} \quad (4.3)$$

Разом з тим, для отримання величин  $K_A$  і  $n$  переважно використовують рівняння Хілла, яке описане рівнянням (5).

На рис.4.10 показано залежності Хілла для розчинів у воді ЛСА-Куркумін при різних температурах.

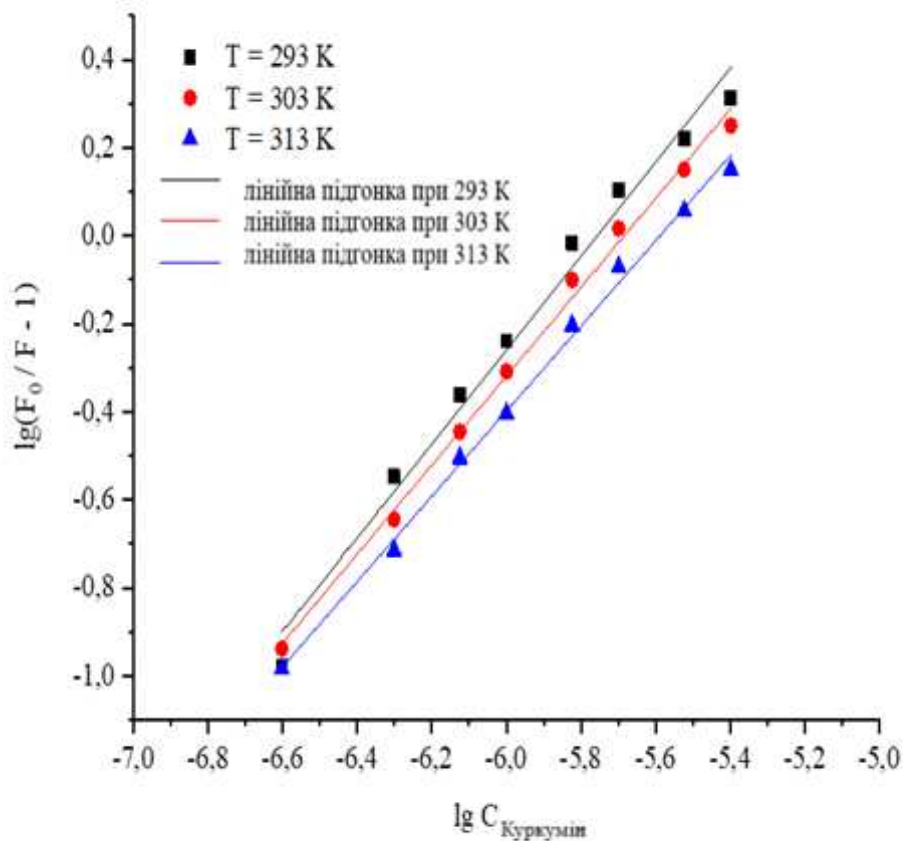


Рис. 4.10. Залежності Хілла для розчинів у воді ЛСА-куркумін при  $T = 293 \text{ К}$  (■),  $303 \text{ К}$  (●),  $313 \text{ К}$  (▲) (Символи відповідають експериментальним результатам, суцільні лінії отримані з підгонки при використанні лінійного рівняння Хілла).

З визначення нахилу прямих для кожної температури і величин, що відсікається цими прямими на осі  $\log [(F_0 - F) / F]$  можна встановити величини  $\lg K_A$  і  $n$ , які наведені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6.

Величини  $K_A$  і  $n$  для розчинів у воді ЛСА-куркумін при різних температурах.

$T(K)$	Параметри зв'язування	
	$\lg K_A$	$n$
293	6.14	1.065
303	5.74	1.010
313	5.4	0.966

Видно, що  $n \approx 1$ , отже має місце лише один сайт зв'язування ліків з протеїном. Із збільшенням температури  $\lg K_A$  зменшується, що є наслідком дисоціації стабільних комплексів, утворених в основному стані (131)

#### 4.3. Зміни термодинамічних параметрів приклад комплексу утворення у водних розчинах ЛСА-кверцетин та ЛСА-куркумін

У відповідності до рівнянь Ван Гоффа розраховані термодинамічні параметри для розчинів у воді ЛСА-кверцетин при різних температурах (таб.4.7) та для розчинів ЛСА-куркумін (таб.4.8).

Видно, що  $\Delta G < 0$  для обох систем вказує на екзотермічних спонтанний механізм комплексу утворення. Відомо, що у випадку  $\Delta H > 0$  і  $\Delta S > 0$  комплексоутворення відбувається за рахунок гідрофобний взаємодії.

Таблиця 4.7.

Термодинамічні параметри для розчинів у воді ЛСА-кверцетин при різних температурах.

Термодинамічні параметри			
$T(K)$	$\Delta G$ (кДж/моль)	$\Delta S$ (Дж · моль <sup>-1</sup> · К <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (Дж/моль)
293	-29,658	-179,6	-82291,5
303	-28,409	-177,8	-82291,5
313	-26,052	-179,7	-82291,5

Таблиця 4.8.

Зміни термодинамічних параметрів  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  та  $\Delta S$  для розчинів у воді ЛСА-Куркумін при різних температурах

Термодинамічні параметри			
$T(K)$	$\Delta G$ (кДж/моль)	$\Delta S$ (Дж · моль <sup>-1</sup> · К <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (кДж/моль)
293	-34,42	-104,23	-64,96
303	-33,28	-104,56	-64,96
313	-32,34	-104,22	-64,96

Якщо  $\Delta H < 0$ , а  $\Delta S > 0$ , то взаємодія в комплексах реалізується в результаті дії електростатичних сил. У випадку, коли  $\Delta H < 0$  і  $\Delta S < 0$ , то комплекси виникають внаслідок водневих зв'язків. Оскільки для розчинів ЛСА-Кверцетин у воді  $\Delta H < 0$ , а  $\Delta S < 0$ , то переважаючими в комплексах є водневі зв'язки. В свою чергу від'ємне значення  $\Delta H$  ( $\Delta H < 0$ ) і негативне значення  $\Delta S$  ( $\Delta S < 0$ ) вказують, що в комплексі ЛСА-Куркумін переважаючими є ван-дер-ваальсівська взаємодія та водневі зв'язки (139).

#### 4.4. Механізм перенесення енергії в комплексах ЛСА-Кверцетин та ЛСА-Куркумін

Перенесення енергії в комплексах може відбуватись як безвипромінюваним шляхом, так і за рахунок передачі від флуорофора до гасника фотонів випромінювання. Важливою характеристикою передачі енергії є інтеграл перекриття спектрів флуоресценції молекул донора та абсорбції молекул акцептора у відповідності до рівняння (3).

На рис.4.11 показано, що для молекул ЛСА і кверцетину спектри флуоресценції і поглинання перекриваються в широкому спектральному діапазоні тобто  $J \neq 0$ .

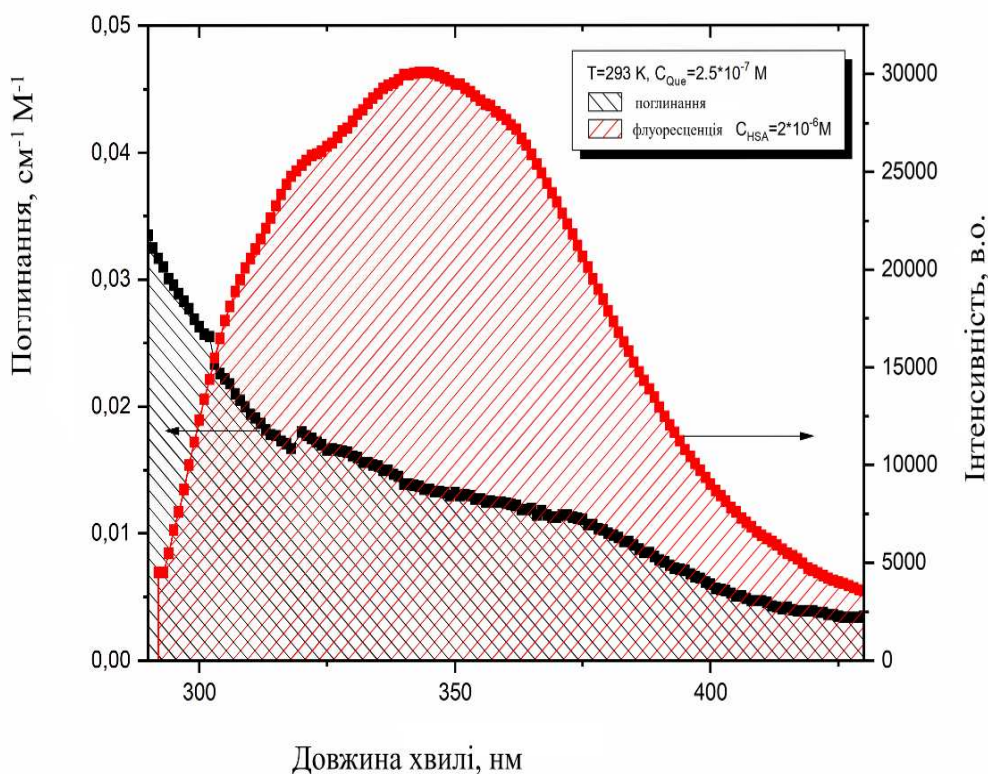


Рис.4.11. Перекриття спектру флуоресценції  $F(\lambda)$  ЛСА (червона крива) спектру поглинання  $\xi(\lambda)$  кверцетину (область перекриття заштрихована).

Інтеграл перекриття виявився рівним  $J = 0.193 \cdot 10^9 \text{ нм}^4/(\text{М} \cdot \text{см})$ . Це значення входить як співмножник до критичного відстані  $R_0$ , за якої ефективність передачі енергії дорівнює 50 %.

Для розрахунку  $R_0^6$  використано значення фактора відносної орієнтації диполей донора і акцептора випромінювання, який у випадку хаотичної орієнтації дорівнює  $k=2/3$ , показник заломлення  $n=1.336$ , квантовий вихід донору у відсутності акцептора  $\Phi = 0,188$  та згадане значення  $J$ . З іншого боку,  $R_0^6$  та відстань між донором і акцептором  $r$  зв'язані з ефективністю перенесення енергії  $E$  у відповідності до наступного рівняння резонансного безвипромінювального перенесення енергії Фьорстера (рівняння 1).

На рис. 4.12. показано спектри емісії флуоресценції ЛСА та поглинання куркуміну в області їх перекривання.

Було встановлено, що відстань Фьорстера  $R_0 = 0.89 \text{ нм}$  та визначена відстань між гасником, тобто кверцетином, та флуорофором – триптофановим амінокислотним залишком протеїну, що дорівнює  $1.35 \text{ нм}$  і є значно меншим ніж гранично допустиме значення  $8-10 \text{ нм}$  для реалізації вказаного механізму.

Для вибраної спектральної області перекриття  $300-500 \text{ нм}$  величина інтеграла перекриття виявилася рівною  $J = 4.071 \cdot 10^9 \text{ нм}^4/(\text{М} \cdot \text{см})$ . Якщо врахувати, що при хаотичній орієнтації диполей, що визначають передачу енергії від донора до акцептора  $k^2 = 2/3$ ,  $N = 1.336$ ,  $\Phi = 0.118$ , то критична відстань Фьорстера дорівнює  $R_0 = 1.5 \text{ нм}$ . При отриманому експериментальному значенні ефективності переносу енергії  $E = 0.16$  відстань між лікарським препаратом Куркумін і залишком амінокислоти, яка є донором енергії випромінювання Trp 214 ЛСА, складає  $r_{exp} \approx 2.2 \text{ нм}$ .

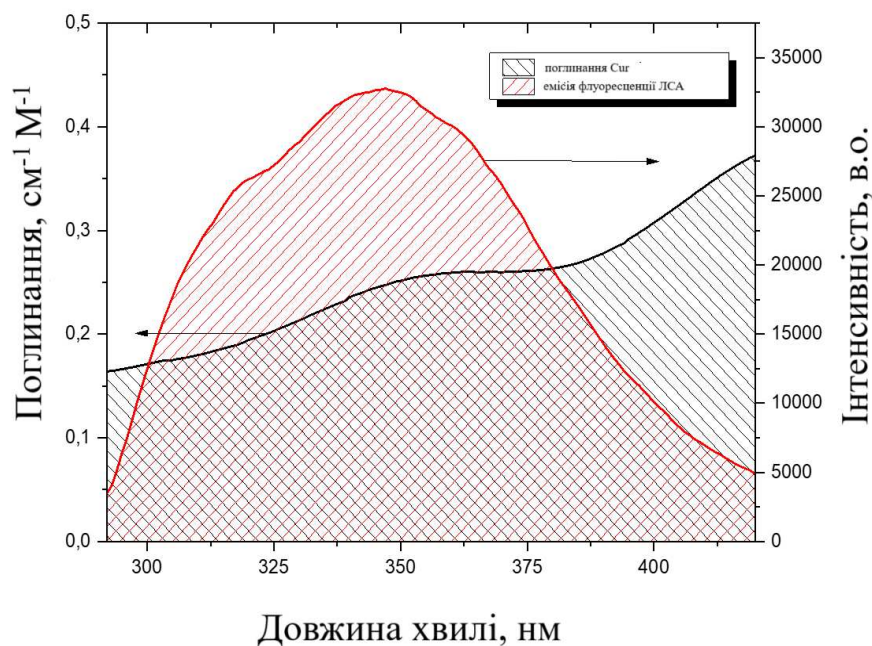


Рис.4.12. Спектр емісії ФЛ  $F(\lambda)$  ЛСА (червона крива) та спектр поглинання  $\zeta(\lambda)$  куркуміну (чорна крива) з концентраціями  $C_{\text{ЛСА}} = 2 \times 10^{-6}$  М,  $C_{\text{Куркумін}} = 2,5 \times 10^{-7}$  М в області перекриття (заштрихована).

Значення  $R_0$  та  $r$ , виходячи з умови Фьорстера  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$ , вказують, що в системі ЛСА-Куркумін гасіння ФЛ реалізується як результат безвипромінювальної резонансної передачі енергії у відповідності до моделі Фьорстера (FRET) (131)

#### 4.5. Комп'ютерне моделювання ЛСА-кверцетин та ЛСА-куркумін

Для детального аналізу взаємодії компонент у комплексі проведено моделювання молекулярного докінгу, в рамках якого структура протеїнової макромолекули (рис.4.1) була фіксованою (жорсткий докінг), молекула ліганда (кверцетин) є гнучкою за рахунок ротаційних ступенів вільності (рис.4.13). Метою докінг-моделювання є пошук оптимальної з енергетичної точки зору моди зв'язування молекул рецептора та ліганда у

комплексі. У програмному пакеті Autodock 4.2 пошук мод виконувався генетичним алгоритмом Ламаркіана з напівемпіричної скорінг-функцією, де враховані лише слабка нековалентна взаємодія.

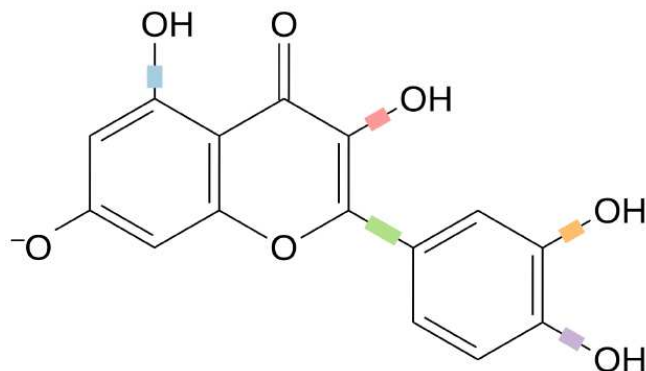
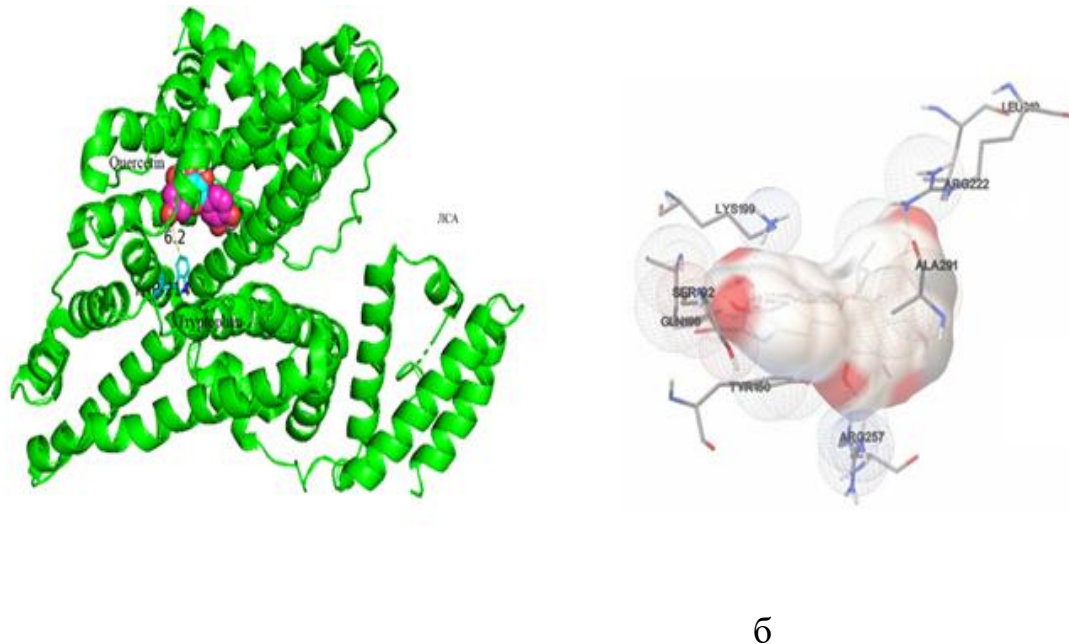


Рис.4.13. Поворотні зв'язки молекули кверцетину  $C_{15}H_{10}O_7$

На рис.4.14 приведені результати моделювання та найближче амінокислотне оточення молекули кверцетину.



а

б

Рис.4.14. Молекулярний комплекс ЛСА-кверцетин з вказаною відстанню в Å до триптофану Trp 214 (а); найближче амінокислотне оточення молекул и кверцетину з вказаними пунктиром водневими зв'язками (б)

Можемо бачити що молекула ліганда розміщується в безпосередній близькості до флуоресцентного триптофанового амінокислотного залишку ЛСА на відстані 0.6 нм та оточена декількома амінокислотними залишками, з якими встановлюються водневі зв'язки. Аналіз інтенсивності взаємодії молекули кверцетину з найближчим оточенням проведено в рамках моделювання молекулярної динаміки.

В результаті докінгу встановлена енергію зв'язування -28.4 кДж/моль молекул у комплексі, значення якої є близьким до отриманого -28 кДж/моль з спектрів гасіння флуоресценції. Також встановлена відстань до триптофанового амінокислотного залишку  $r_{\text{comp}} \approx 1$  нм, яка також не відрізняється суттєво від встановленого в рамках теорії Фьорстера.

Моделювання молекулярної динаміки проводилось у програмному пакеті Desmond для наступних параметрів системи:

- комірка 10 нм × 10 нм × 10 нм з періодичними межевими умовами;
- часовий інтервал 6 нс з кроком моделювання 1.2 фс;
- NPT-ансамбль при температурі  $T=300$  К та тиску  $p = 1$  атм;
- поле сил OPLS (Optimized Potential for Liquid Systems);
- явна модель водного розчинника TIP3 з рівнем рН=5.5, для електронейтральності системи додані йони  $\text{Na}^+$ ;
- вихідним положенням є найбільш оптимальна мода зв'язування отримана методом докінг-моделювання.

В процесі моделювання проаналізована інтенсивність та типи взаємодії молекули кверцетину з кожним амінокислотним залишком з найближчого оточення, динаміка даної взаємодії в часі. Молекулярний комплекс препарату та протеїну у заданому сайті зв'язування виявляється стійким у часі. На рис.4.15 продемонстровано діаграма тривалості взаємодії молекули кверцетину з амінокислотними залишками альбуміну за проміжок часу 6 нс.

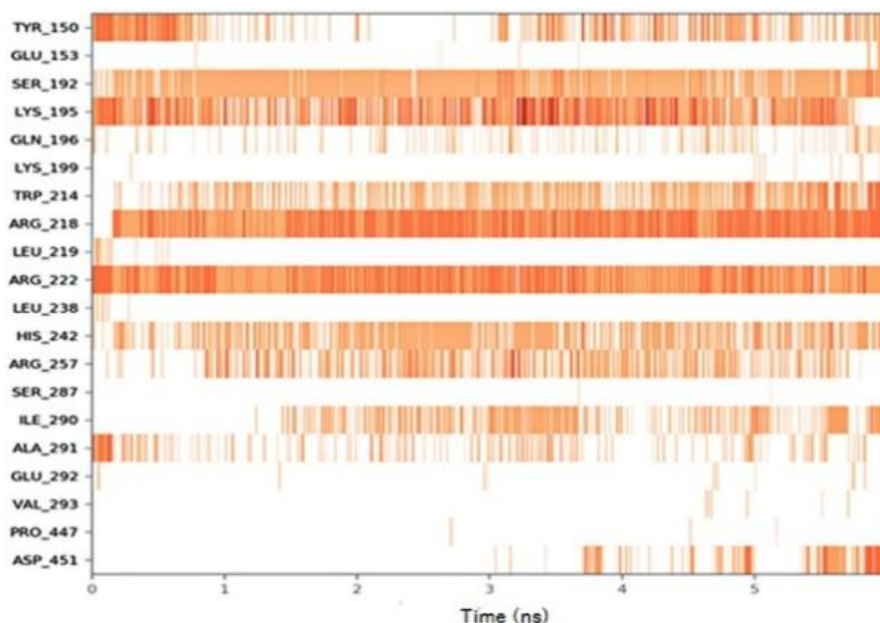


Рис.4.15. Часова діаграма частоти взаємодії молекули кверцетину з амінокислотними залишками ЛСА.

Найчастіше та найтриваліше кверцетин взаємодіє з амінокислотними залишками Ser-192, Lys-195, Trp-214, Tyr-150, Arg-218, Arg-222, His-242. З позитивно зарядженими Arg-218, Arg-222 та полярними Ser-192, His-242 кверцетин взаємодіє переважно завдяки встановленим водневим зв'язкам (рис.4.16 та 4.17).

Іонна взаємодія виникає завдяки присутності іонів  $\text{Na}^+$  у системі. З Lys-195, Trp-214 та Tyr-150 взаємодія молекули кверцетину має переважно гідрофобний характер, зокрема з Lys-195 проявляється  $\pi$ -катионний зв'язок, з триптофановим залишком Trp-214 утворюється  $\pi$ - $\pi$  стекінг.

З деякими амінокислотними залишками взаємодія кверцетину виникає за рахунок так званих водних містків (рис.4.16). Загалом характер взаємодії, встановлений в результаті моделювання молекулярної динаміки підтверджує та детально доповнює висновки з експериментальних спектрів флуоресценції водних розчинів ЛСА-кверцетин.

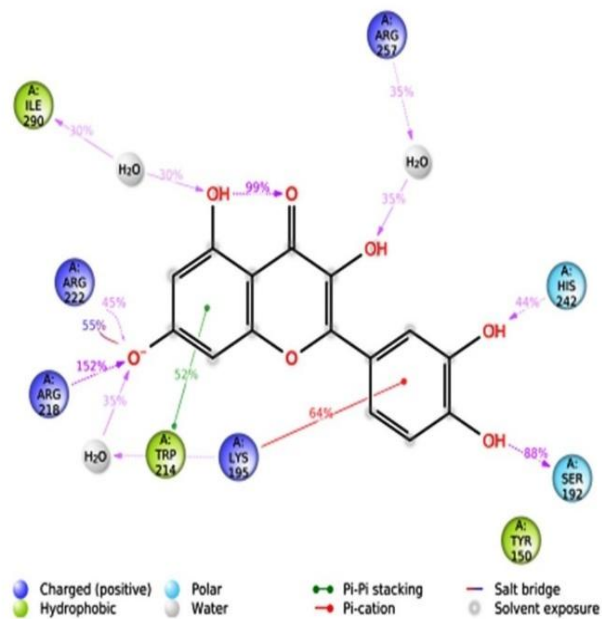


Рис.4.16. Детальні взаємодії атомів ліганду з білковими залишками.

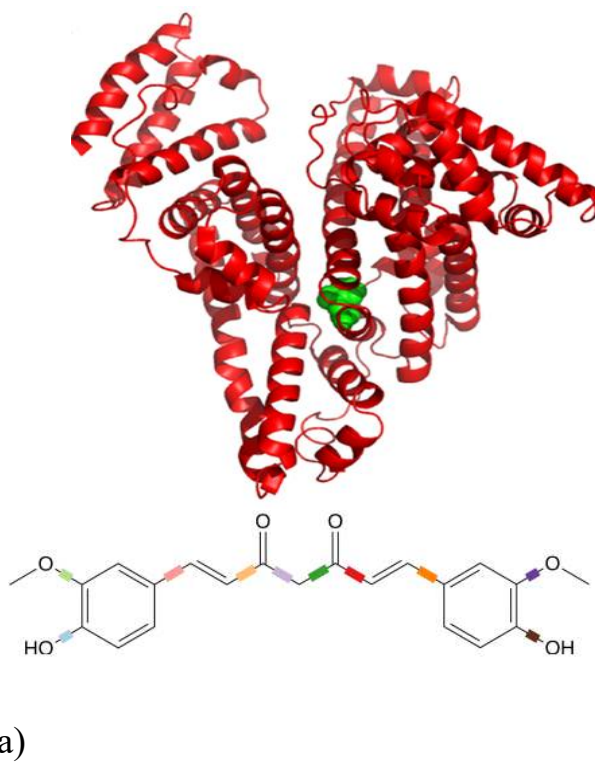


Рис.4.17. Молекула ЛСА з вказаним зеленим єдиним триптофановим амінокислотним залишком Trp-214 (а); молекула куркуміну  $C_{21}H_{20}O_6$  з зазначеними кольором поворотними зв'язками (б).

У процесі моделювання ЛСА з куркуміном структура протеїнової молекули (рис.4.18 (а)) була жорстко зафіксованою (жорсткий докінг), молекула ліганда (куркумін) вважалась гнучкою за рахунок наявності 10 ротаційних ступенів вільності для деяких зв'язків (див. рис. 4.17(б)).

Пошук оптимальних з енергетичної точки зору мод зв'язування у Autodock 4.2 здійснювався за допомогою генетичного методу Ламаркіана з напівемпіричної скорінг-функцією, де враховані лише слабка нековалентна взаємодія: електростатична, ван-дер-ваальсівські та водневі зв'язки, вплив розчинника. На рис.4.18 (а) вказано найоптимальніше місце зв'язування молекули куркуміну з макромолекулою ЛСА, отримане в результаті докінг-моделювання за нормальних умов. Також на рисунку зазначена відстань між молекулою препарату та єдиним у структурі ЛСА флуоресцентним триптофановим амінокислотним залишком Trp-214  $r_{comp} \approx 1.6$  нм. Значення уможлиблює реалізацію механізму Фьорстера нерадіаційної передачі енергії збудження від триптофану до куркуміну, що призводить до гасіння флуоресценції досліджуваних водних розчинів ЛСА-куркумін.

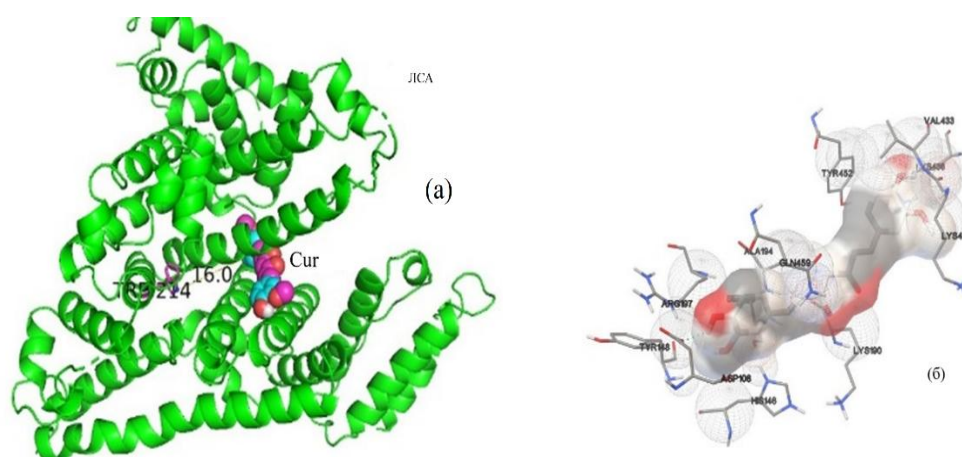


Рис.4.18. Молекулярний комплекс ЛСА-Куркумін з вказаною в Å відстанню до триптофану Trp-214 (а); найближче амінокислотне оточення куркуміну з вказаними водневими зв'язками (зелений пунктир) в місці зв'язування (б)

На рис.4.18 (б) представлено найближче амінокислотне оточення молекули куркуміну в утвореному комплексі. Молекула куркуміну знаходиться в оточенні таких амінокислотних залишків: Asp-106, His-146, Lys-190, Lys-432, Val-433, Lys-436, Gln-459, Ala-194, Arg-197, Tyr-148. Крім того, з Tyr-148 було утворено водневий зв'язок. Встановлена енергія зв'язування  $\Delta G_{comp} \approx -31.9 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$  відповідає отриманому в результаті обробки експериментальних даних спектрів флуоресценції. Детальний аналіз характеру та стійкість взаємодії молекули куркуміну з амінокислотними залишками ЛСА залежить від розчинника, тому буде проведено в рамках моделювання молекулярної динаміки.

Положення молекули куркуміну в отриманому з докінгу сайті зв'язування виявляється стійким у часі. На рис.4.19 представлені амінокислотні залишки, взаємодія молекули куркуміну з якими є найінтенсивнішою протягом інтервалу моделювання: заряджені Asp-108, Arg-197 та гідрофобні Val-462, Val-456, Ala-191 та Ala-194 (130,131).

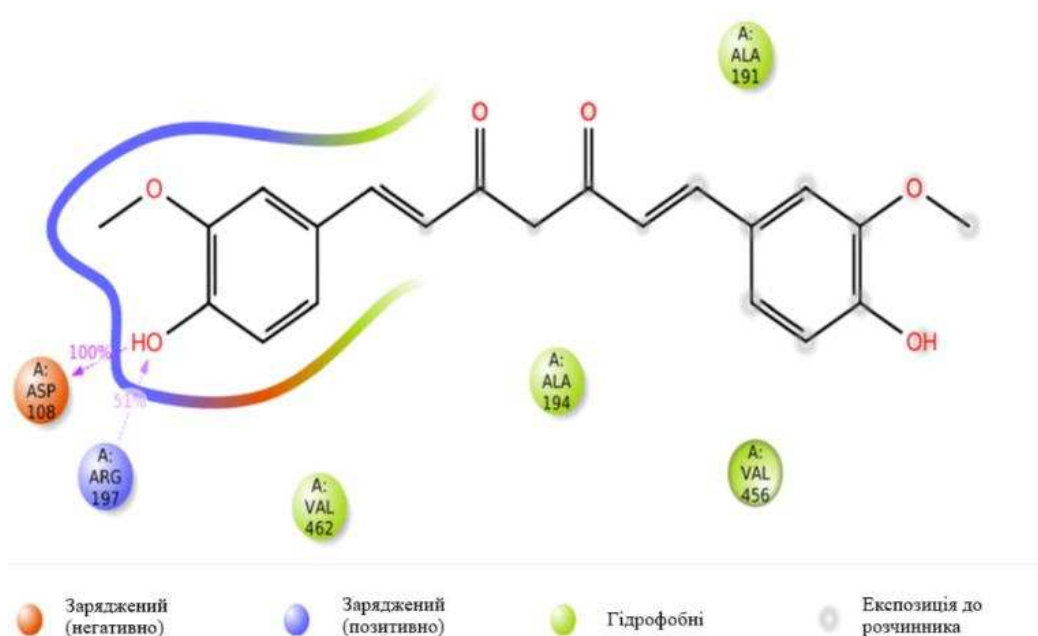


Рис. 4.19. Амінокислотні залишки з найближчого оточення молекули куркуміну з зазначеним типом.

Одержані результати підтверджують ключову роль водневих зв'язків і водяних містків у формуванні комплексів куркуміну з ЛСА. Встановлено, що ці міжмолекулярні взаємодії сприяють стабільності утворених структур, що може бути важливим для їхньої біологічної активності та потенційного застосування у фармацевтиці. Таким чином, отримані дані поглиблюють розуміння механізмів взаємодії досліджуваних сполук і можуть слугувати основою для подальшого моделювання їхніх комплексів у розчині.

#### Висновки до розділу 4

1. Дослідження водних розчинів ЛСА-кверцетин методами флуоресцентної спектроскопії показало, що зі збільшенням вмісту препарату в розчині при різних температурах спостерігається зменшення інтенсивності. Гасіння флуоресценції відбувається в результаті комплексоутворення молекул в основному стані.
2. Зміни термодинамічних параметрів вказують на те, що гетероасоціація ЛСА з кверцетином відбувається переважно за рахунок водневих зв'язків, але величина змін  $\Delta H$  і  $\Delta S$  не виключає впливу гідрофобних сил.
3. Перенесення енергії між донором (ЛСА) і акцептором (кверцетином) здійснюється за допомогою механізму Ферстера (FRET). Комплексоутворення відбувається зі зміною вторинної структури внаслідок зміни гідрофобного локального оточення біля амінокислотного залишку Trp-214. Комп'ютерне моделювання підтверджує складний характер взаємодії в системі ЛСА-кверцетин.
4. У водних розчинах ЛСА з лікарським препаратом куркуміном спостерігається помітне гасіння випромінювання і збудження ФЛ спостерігається зі збільшенням вмісту гасника (куркуміну) енерговмісту при температурах 293, 303 і 313 К. Отримані константи Штерна-Вольмера  $K_{SV}$  і  $K_q$  при різних температурах вказують на те, що гасіння відбувається в результаті утворення комплексів ЛСА-куркумін в основному стані. Це підтверджується отримані залежності константи зв'язування від температури, які зростають із збільшенням  $1/T$ .
5. Гасіння флуоресценції відбувається за рахунок передачі енергії від донорних флуорофорів ЛСА (переважно залишку Trp-214) до препарату (акцептора) за FRET-механізмом. Теорія Форстера для FRET дозволила встановити розбіжність між донором і акцептором,

що добре узгоджується з результатами моделювання комплексів методом молекулярного докінгу. Зв'язування молекул в комплексі є міцним, кількість місць зв'язування близька до одиниці, що вказує на один на один тип сайту зв'язування для молекули лікарської речовини.

6. Розраховані зміни термодинамічних параметрів при утворенні комплексів відповідають спонтанному ентальпійному процесу, зумовленому водневими зв'язками. Детальний аналіз взаємодії з використанням методами молекулярного моделювання також показує значний внесок гідрофобної взаємодії у формування комплексу ЛСА-куркумін.

## РОЗДІЛ 5

### КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БСА З КВЕРЦЕТИНОМ ТА КУРКУМІНОМ

#### 5.1. Гетероасоціація та параметри взаємодії в комплексах БСА - кверцетин та БСА – куркумін

Для визначення механізмів взаємодії молекул БСА та кверцетину досліджувались флуоресцентні властивості водних розчинів даних речовин при фіксованій концентрації протеїну та зростаючій концентрації молекул ліганда (кверцетину) при трьох значеннях температур. Відповідні спектри флуоресценції збудження та емісії приведені на рис.5.1.

Як видно з рисунків, при зростанні концентрації кверцетину відбувається гасіння флуоресценції розчинів, пов'язане з релаксацією збуджених флуоресцентних енергетичних рівнів триптофанових амінокислотних залишків Trp-134 та Trp-213 протеїнової макромолекули БСА. Дані амінокислотні залишки дають основний внесок у інтенсивність флуоресценції розчинів БСА та знаходяться у субдоменах ІВ та ІІА  $\alpha$ -спіралі вторинної структури, відповідно.

Для розрахунків параметрів гасіння та зв'язування між БСА та кверцетином використовувались рівняння 3.4-3.5.

З нахилу ліній, наведених на графіку, визначені константи  $K_{sv}$  та  $K_q$  ( $K_q = K_{sv} / \tau_0$ ), а їх значення наведено в таблиці 5.1.

Значення константи  $K_q$  перевищує максимальне для БСА  $K_{q,max} = 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  та немонотонно залежить від температури. Це свідчить, що в системі БСА-кверцетин має місце статичний механізм гасіння флуоресценції [96], пов'язаний з утворенням кон'югатів БСА-кверцетин та передачею енергії збудження від донора (триптофан) до акцептора (кверцетин) без випромінювання фотона

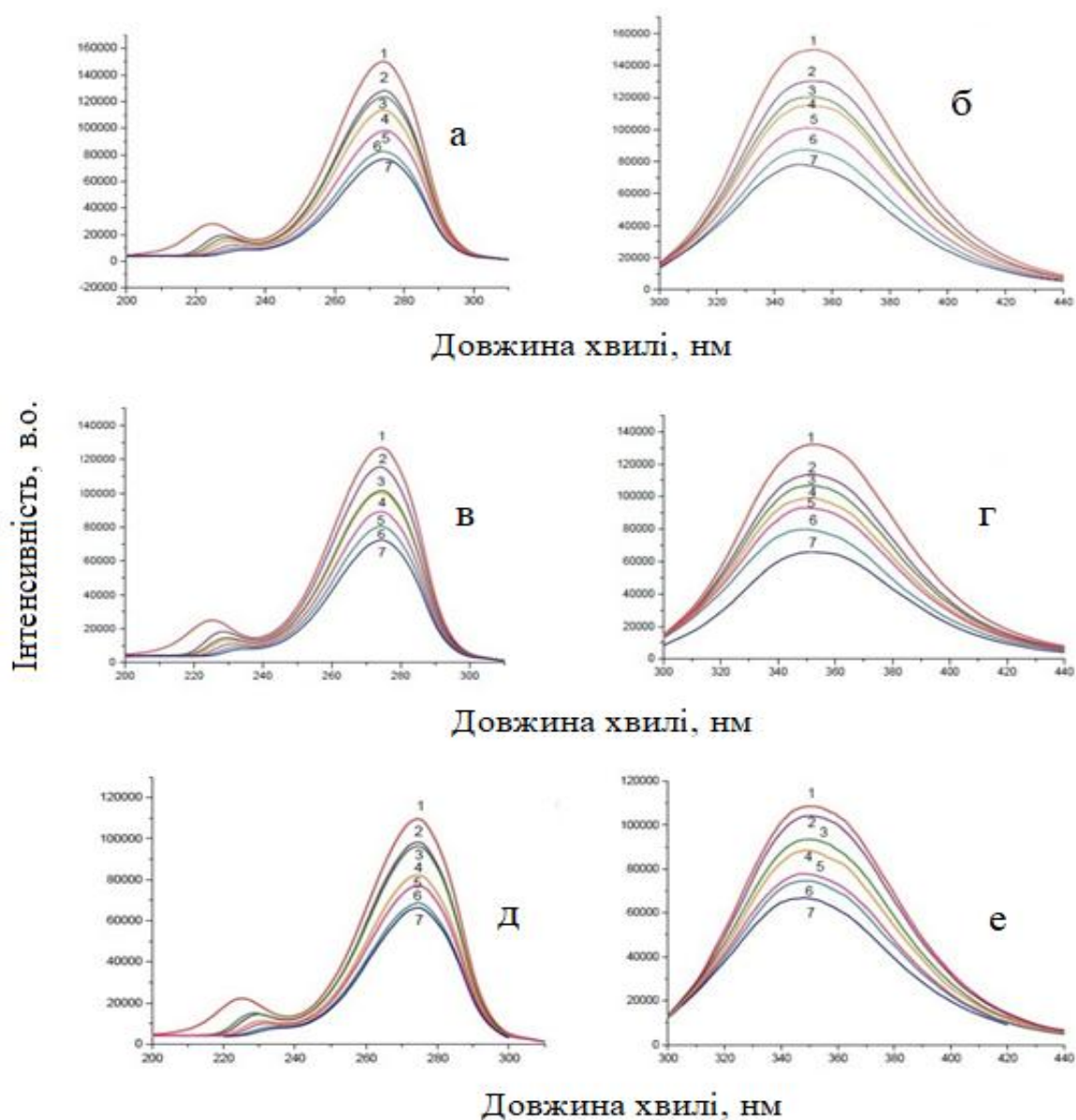


Рис. 5.1. Спектри збудження флуоресценції (а,в,г) та емісії флуоресценції (б,д,е) водних розчинів БСА-Кверцетин при незмінній концентрації альбуміну ( $C_{BSA} = 2 \cdot 10^{-6} M$ ) і змінній концентрації кверцетину ( $C_{Que}$  0 (1),  $2.5 \cdot 10^{-7}$  (2),  $5 \cdot 10^{-7}$  (3),  $7.5 \cdot 10^{-7}$  (4),  $10^{-6}$  (5),  $2 \cdot 10^{-6}$  (6),  $3 \cdot 10^{-6}$  (7) M) (pH = 5.5, T = 293 K (а,б), 303 K (в,г), 313 K (д,е),  $\lambda_{зб} = 274$  нм,  $\lambda_{ем} = 354$  нм).

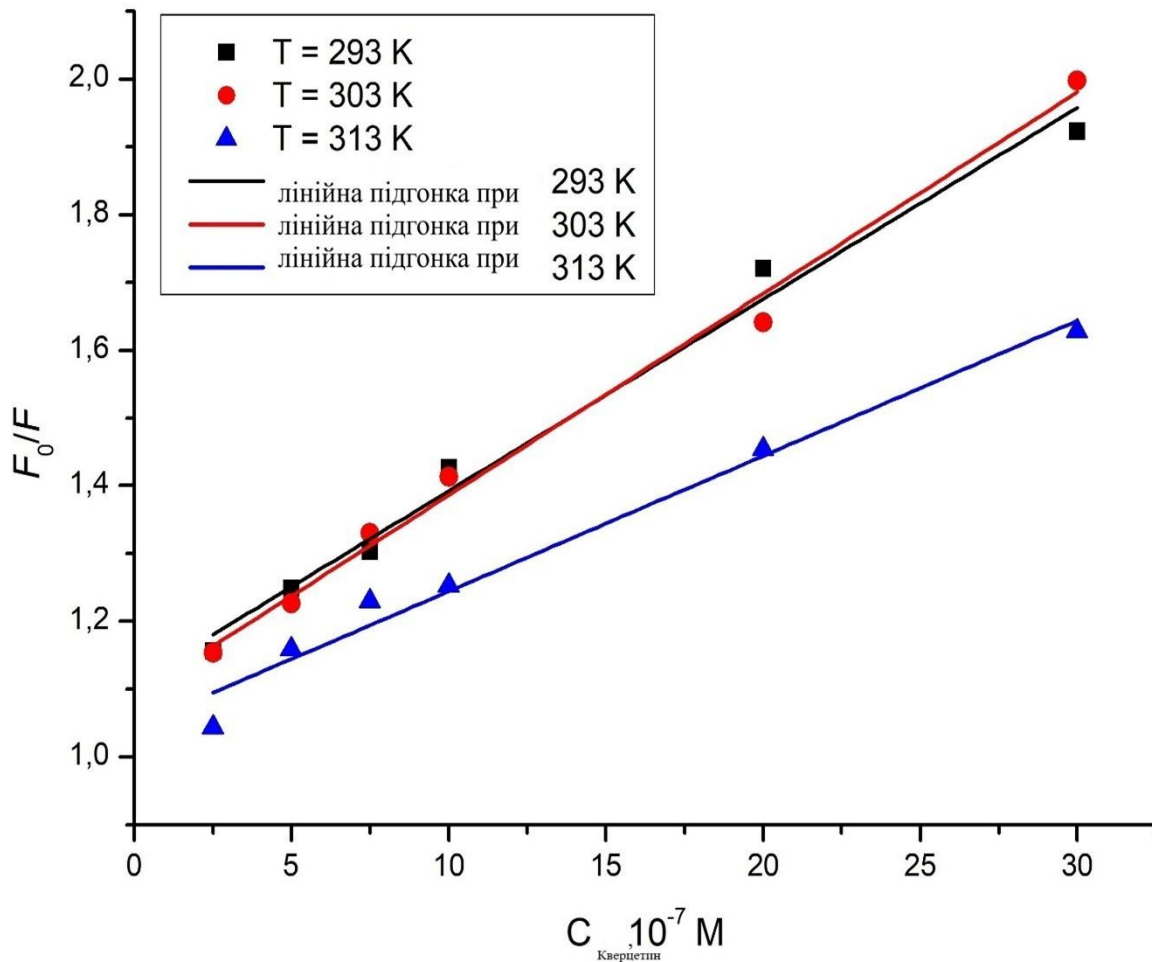


Рис.5.2. Залежності Штерна-Вольмера комплексів БСА-кверцетин отримані для експериментальних точок при  $T = 293 \text{ K}$  (■),  $303 \text{ K}$  (●),  $313 \text{ K}$  (▲)

Таблиця 5.1.

Константи гасіння флуоресценції водних розчинів БСА-кверцетин при різних температурах

Т,К	Параметри гасіння		Кореляція R
	$K_q, \text{ M} \cdot \text{ s}^{-1}$	$K_{sv}, \text{ M}^{-1}$	
293	$8,15 \times 10^{11}$	$8,15 \times 10^3$	0.9703
303	$8,92 \times 10^{11}$	$8,92 \times 10^3$	0.882
313	$9,53 \times 10^{11}$	$9,53 \times 10^3$	0.8757

На рис.5.3 показані залежності Хілла, отримані з спектрів емісії флуоресценції — точки та їх лінійні апроксимації, що дозволяють визначити параметри зв'язування, наведені у таблиці 5.2. Константа зв'язування та кількість місць зв'язування зменшуються зі збільшенням температури, що характерно для статичного механізму гасіння.

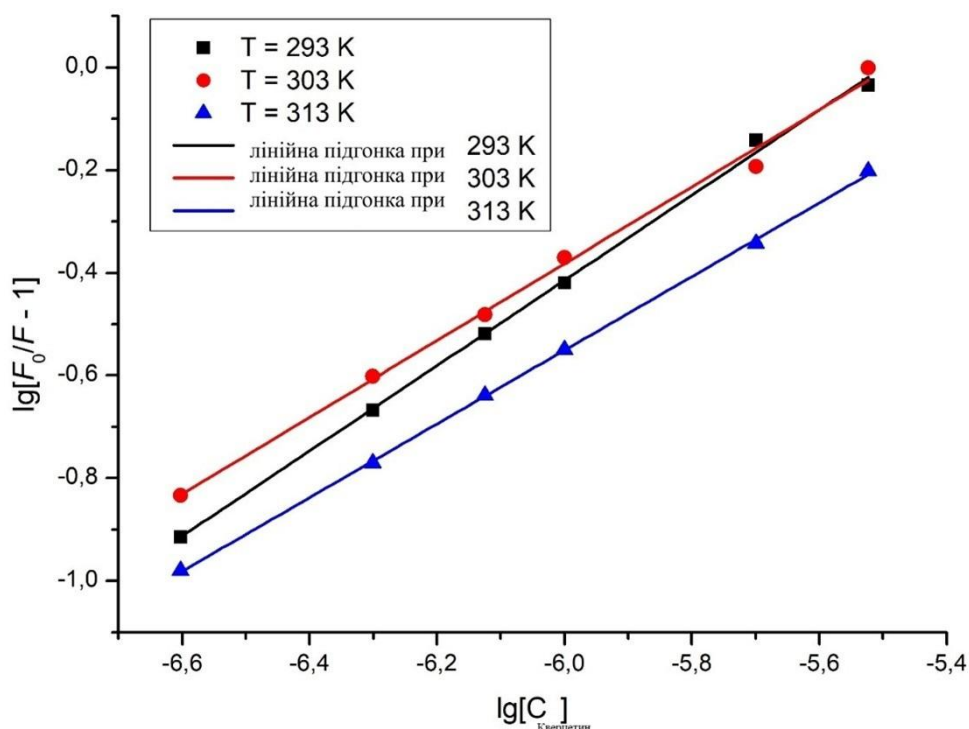


Рис.5.3. Залежності Хілла, отримані для експериментальних точок при  $T = 293$  К (■),  $303$  К (●),  $313$  К (▲)

Таблиця 5.2

Константи зв'язування в лігандах БСА-кверцетин при різних температурах.

$T(K)$	Параметри зв'язування		
	$lgK_A$	$n$	$R$
293	$4.56 \pm 0.098$	$0.83 \pm 0.01$	0.9981
303	$4.12 \pm 0.158$	$0.75 \pm 0.02$	0.9939
313	$3.75 \pm 0.038$	$0.72 \pm 0.00$	0.9996

Відповідно до рівняння (5), можна обчислити, що кількість місць зв'язування між БСА та кверцетином становить близько 1, що свідчить про те, що кожна молекула альбуміну зв'язується лише з однією молекулою кверцетину.

В свою чергу оскільки куркумін належить до гідрофобних лікарських препаратів, то можна очікувати встановлення сильної неспецифічної взаємодії внаслідок сил гідрофобної природи альбуміна та вказаного ліганда. З двох відомих сайтів зв'язування для куркуміну більш важливим є сайт I, розміщений у субдомені II A, який представляє собою гідрофобний карман глобулярної структури альбуміну. Незважаючи на те, що вказане зв'язування належить слабким зв'язкам, воно відіграє важливу роль в фармакінетичних. фармадинамічних властивостях і токсичних властивостях ліків, як лігандів комплексів з альбумінами. За рахунок транспортної функції протеїна комплексоутворення з ліками супроводжується пролонгацією їх терапевтичного ефекту, забезпеченням необхідної концентрації препарату в місці мішені.

З іншого боку один з амінокислотних залишків Trp-212, який також локалізований в об'ємі гідрофобної порожнини макромолекули, в результаті взаємодії з лігандом, зазнає зміни в флуоресцентних властивостях. В першу чергу ці зміни визначаються енергетичною структурою молекулярних орбіталей протеїну та ліганда і за певних умов появою гасіння ФЛ флуорофора внаслідок перенесення енергії збудження від донора до гасника (акцептора) енергії.

На рис.5.4. наведено спектри емісії та збудження БСА флуоресценції у водному розчині. При додаванні до розчину у воді БСА з постійною концентрацією ( $C_{\text{БСА}}=2 \cdot 10^{-6}$  М) розчинів Куркумін в DMSO оптична густина в положенні 280 нм зростає і зміщується в червону область (рис.5.5).

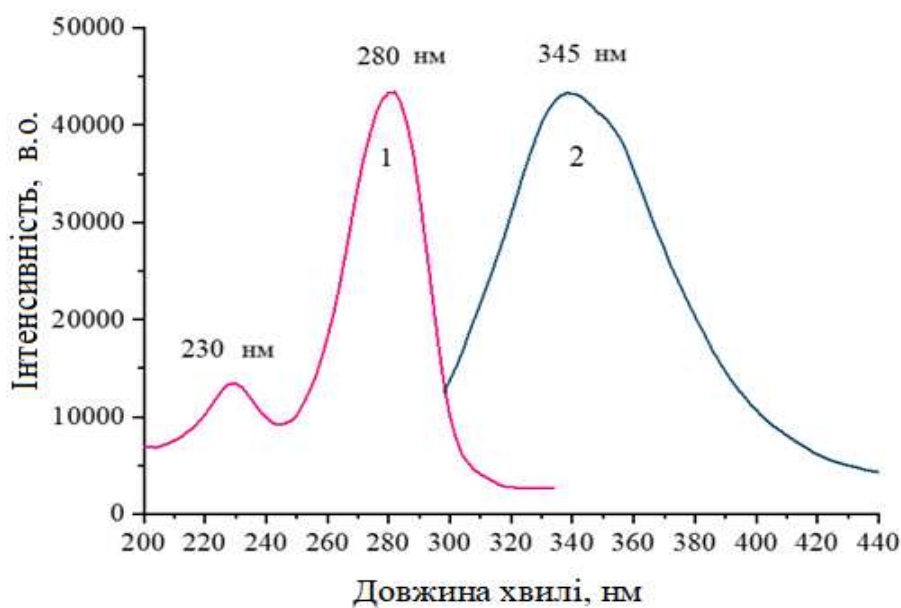


Рис.5.4. Спектри збудження ( $\lambda_{em} = 345$  нм) (1) та емісії ( $\lambda_{ex} = 280$  нм) (2) флуоресценції БСА у водному розчині ( $C_{BSA}=2 \cdot 10^{-6}$  М М) (рН=5.5;  $T=294$  К).

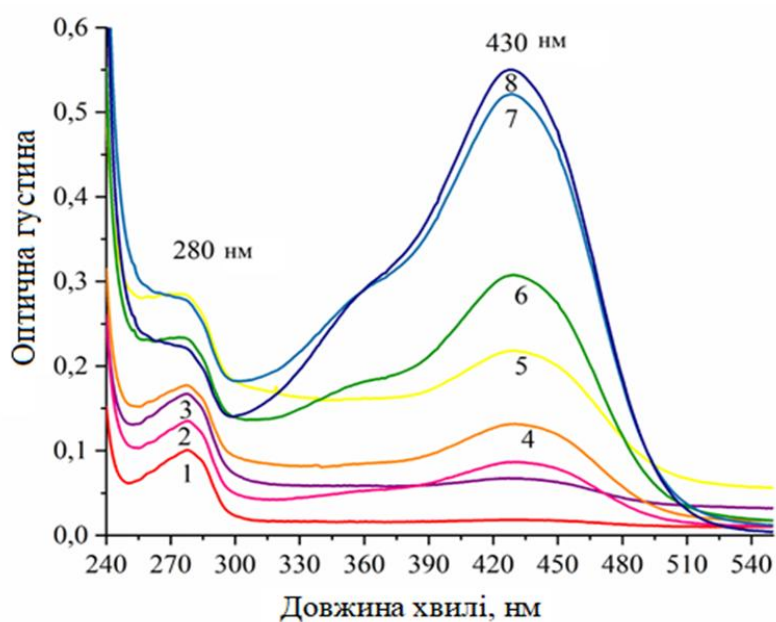


Рис.5.5. Спектри оптичної густини розчину у воді БСА ( $C_{BSA}=2 \cdot 10^{-6}$  М М) без (1) та після додавання розчинів куркумін з DMSO з концентраціями 2.5 (2), 5.0 (3),  $7.5 \cdot 10^{-7}$  М М(4); 1.0 (5), 2.0 (6), 3.0 (7),  $4 \cdot 10^{-6}$  М (8) (рН=5.5;  $T=293$  К).

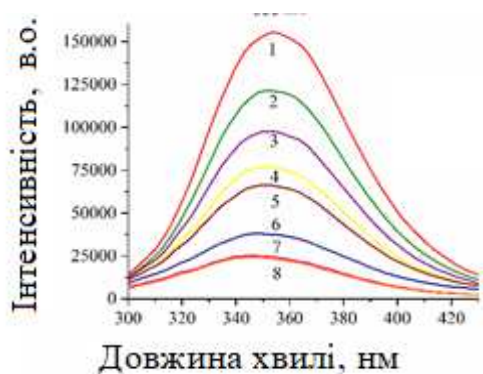
Крім смуги поглинання, зумовленої розчином протеїну виникає нова широка смуга з максимумом біля 430 нм і плече біля 350 нм. Останні смуги пов'язані з молекулами куркуміну.

З ростом вмісту лікарського препарату оптична густина смуги куркумін зростає. Вказана поведінка оптичної густини свідчить про утворення в розчинах БСА-куркумін комплексів, параметри яких можна визначити, скориставшись рівняннями Штерна-Фольмера і Хілла (124,125,140–144).

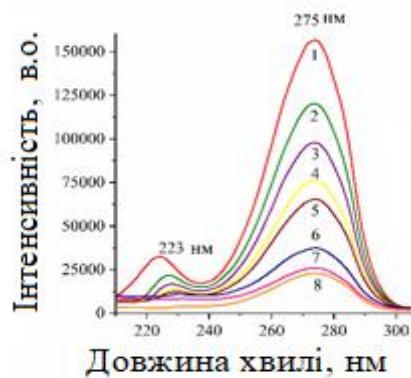
На рис.5.6 наведено спектри емісії та збудження флуоресценції для розчинів БСА-куркумін за різних температур.

Спостерігається зменшення інтенсивності флуоресценції, яке не має прямої кореляції з концентрацією флуорофора, може також бути наслідком ефекту внутрішнього фільтра. Цей ефект виникає через високе поглинання зразка на довжинах хвиль збудження або випромінювання, що зменшує кількість фотонів, які досягають флуорофора або виходять зразка у вигляді флуоресцентного випромінювання. Як наслідок, спостерігається зниження інтенсивності флуоресценції, що може призводити до спотворення отриманих спектральних характеристик.

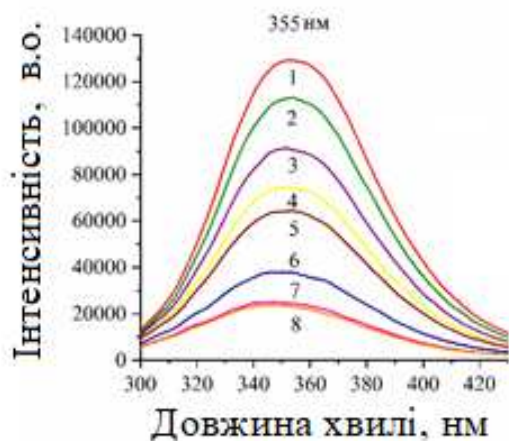
Для врахування ефекту внутрішнього фільтра в спектроскопічних дослідженнях існують математичні методи корекції, які дозволяють компенсувати вплив поглинання на виміряні спектри (109). Однак у даній роботі корекцію не застосовували, оскільки в досліджуваних концентраціях зразки мали низькі значення поглинання ( $<0,05$ ). У цьому діапазоні ефект внутрішнього фільтра є мінімальним і незначно впливає на отримані результати. Це підтверджує коректність отриманих спектральних характеристик і достовірність проведених вимірювань.



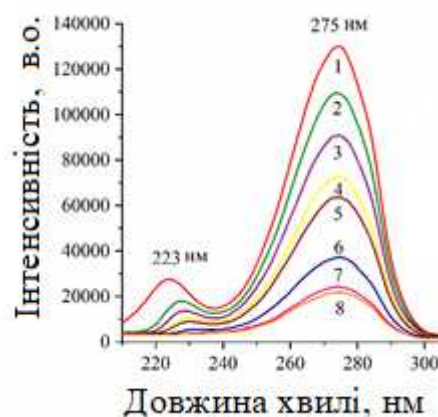
а



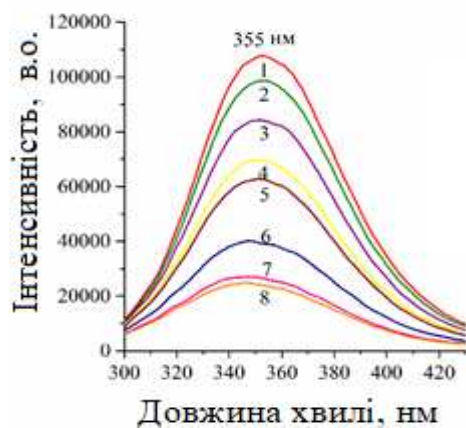
б



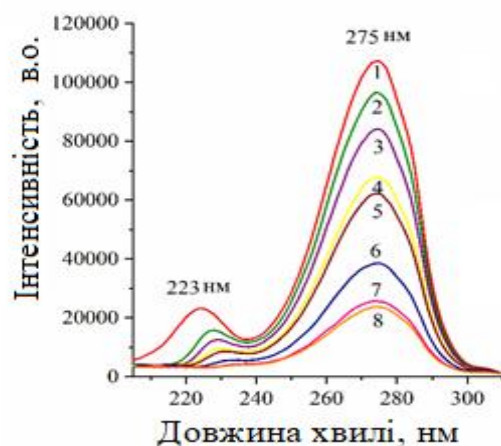
в



г



е



Д  
Рис.5.6. Спектри емісії (а,в,е) ( $\lambda_{ex} = 275$  нм) та збудження (б,г,д) ( $\lambda_{em} = 355$  нм) ФЛ для розчинів у воді БСА з постійною концентрацією  $C_{BSA} = 2 \cdot 10^{-6}$  М та БСА-куркумін після додавання розчину куркуміну в DMSO з вмістом 0 (1), 2.5 (2), 5.0 (3),  $7.5 \cdot 10^{-7}$  М(4); 1.0 (5), 2.0 (6), 3.0 (7),  $4 \cdot 10^{-6}$  М (8) за температур 293 К(а,б), 303 К (в,г) 313 К (д,е) (рН=5.5).

Для визначення механізму гасіння флуоресценції побудовані залежності Штерна-Вольмера (рис.5.7).

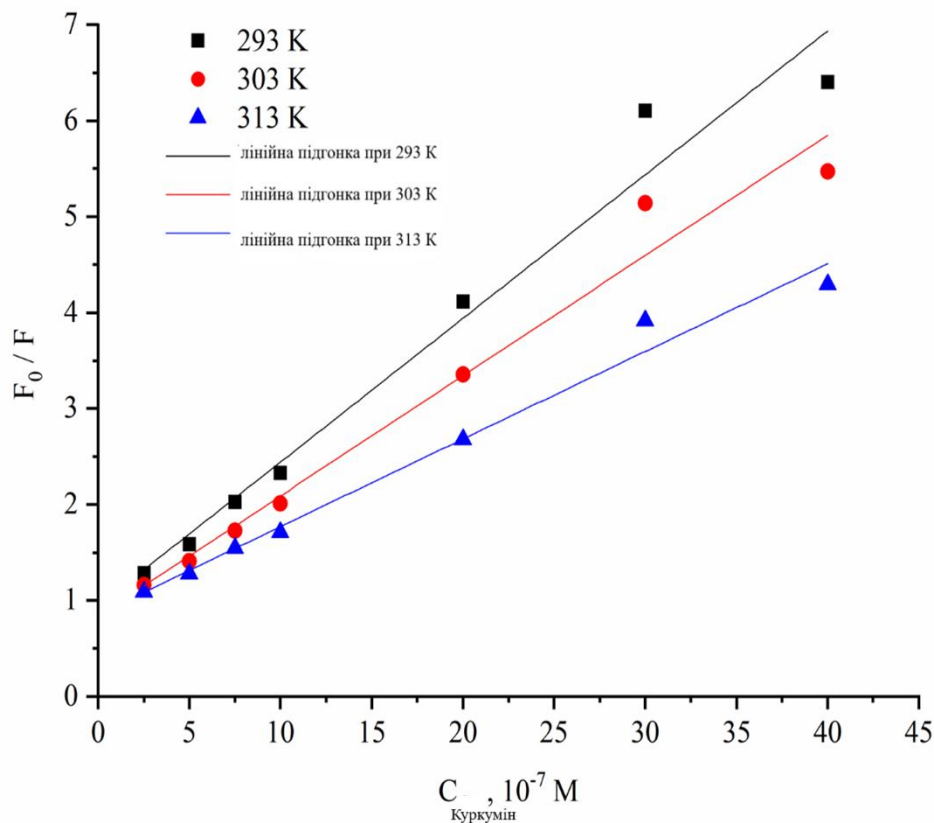


Рис.5.7. Залежності Штерна-Вольмера для розчинів БСА-куркумін для температур  $T = 293 \text{ K}$  (■),  $303 \text{ K}$  (●),  $313 \text{ K}$  (▲) (символи відповідають експериментальним даним, суцільні лінії представляють підгонку результатів з допомогою рівняння Штерна-Вольмера).

Видно, що експериментальні результати для розчинів БСА-куркумін добре узгоджуються з лінійною залежністю гасіння флуоресценції від концентрацій куркуміну [Куркумін]. Разом з тим, лінійна залежність  $F_0/F$  від [Куркумін] для найвищої температури  $313 \text{ K}$  має найменший нахил. Значення констант гасіння  $K_{SV}$  і  $K_q$  наведено у таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Величини констант гасіння  $K_{SV}$  і  $K_q$  для розчинів БСА-куркумін для різних температур

Т,К	Параметри гасіння		Кореляція R
	$K_q, \times 10^{14}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$K_{sv}, \times 10^6, M^{-1}$	
293	1.49	1.49	0.966
303	1.25	1.25	0.971
313	0.91	0.91	0.981

З підвищенням температури  $K_{SV}$  падає, що не відповідає механізму динамічного гасіння. Аналогічно, величина  $K_q$  не перевищує максимально можливе значення  $K_{q,max} = 2 \cdot 10^{10} M^{-1}c^{-1}$ , що також не узгоджується з механізмом взаємодії молекул шляхом зіткнення при їх дифузійному русі. Для визначення параметрів зв'язування  $K_A$  та  $n$  було використано побудову залежностей Хілла та використано рівняння Хілла для підгонки експериментальних даних (рис.5.8).

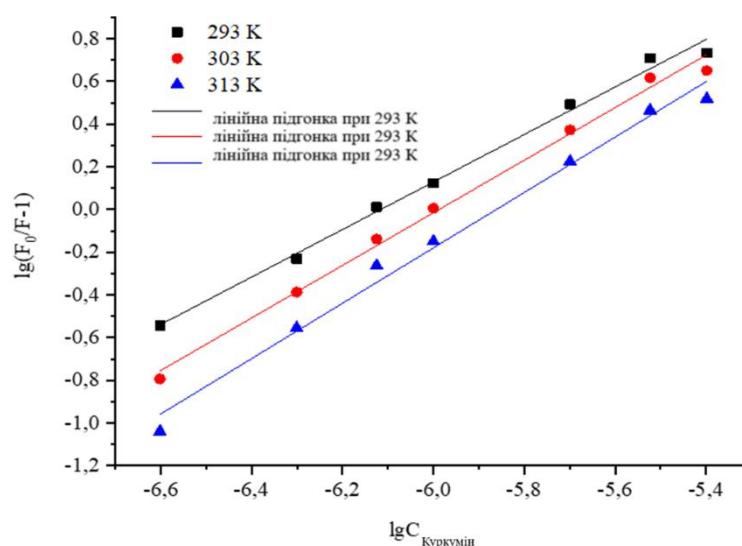


Рис.5.8. Залежності Хілла для розчинів БСА-куркумін за температур 293 К (■), 303 К (●), 313 К (▲). (Символи відповідають експериментальним даним, суцільні лінії зв'язані з підгонкою при використанні рівняння Хілла).

Значення константи зв'язування  $K_A$  та числа місць зв'язування  $n$  за різних температур наведено в таблиці 5.4.

Таблиця 5.4

Константи зв'язування  $K_A$  та число місць зв'язування  $n$  для розчинів БСА-куркумін для різних температур.

Т(К)	Параметри зв'язування		Кореляція
	$lgK_A$	$n$	
293	6,8	1,119	0.9926
303	7,37	1,23	0.9925
313	7,59	1,29	0.9866

Видно, що число місць зв'язування  $n$  для розчинів БСА-куркумін при всіх температурах залишається незмінним і відповідає молярному стехіометричному відношенню 1:1 (129,145).

## 5.2. Зміни термодинамічних параметрів комплексоутворення у водних та механізм перенесення енергії в комплексах БСА-кверцетин та БСА-куркумін

З рівнянь (6)-(8) було визначено ентальпію  $\Delta H$ , вільну енергію  $\Delta G$  та ентропію  $\Delta S$  (таб.5.5), що в свою чергу дозволить встановити переважаючий фізичний характер взаємодії.

Від'ємне значення  $\Delta G$  говорить про спонтанний характер взаємодії. Значення термодинамічних параметрів  $\Delta H$  та  $\Delta S$  свідчать про переважаючу роль водневих зв'язків в утворенні кон'югатів БСА-кверцетин. Більш детальний аналіз взаємодії молекул буде приведено в огляді результатів молекулярного моделювання комплексів БСА-кверцетин.

Таблиця 5.5

## Термодинамічні характеристики розчинів БСА-кверцетин

Термодинамічні параметри			
$T$ (K)	$\Delta G (\times 10^3 \text{ кДж/моль})$	$\Delta S (\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H (\times 10^3 \text{ Дж/моль})$
29	$-28.48 \pm 0.24$	$-120.58 \pm 0.05$	
30	$-27.81 \pm 0.4$	$-118.81 \pm 0.04$	$-63.81 \pm 12.8$
31	$-25.49 \pm 0.1$	$-122.43 \pm 0.04$	

З перекриття спектрів емісії флуоресценції водного розчину БСА та поглинання кверцетину (рис.5.9) та застосовуючи формули (1)-(3) порахуємо значення інтегралу перекриття та відстань між молекулами донора та акцептора.

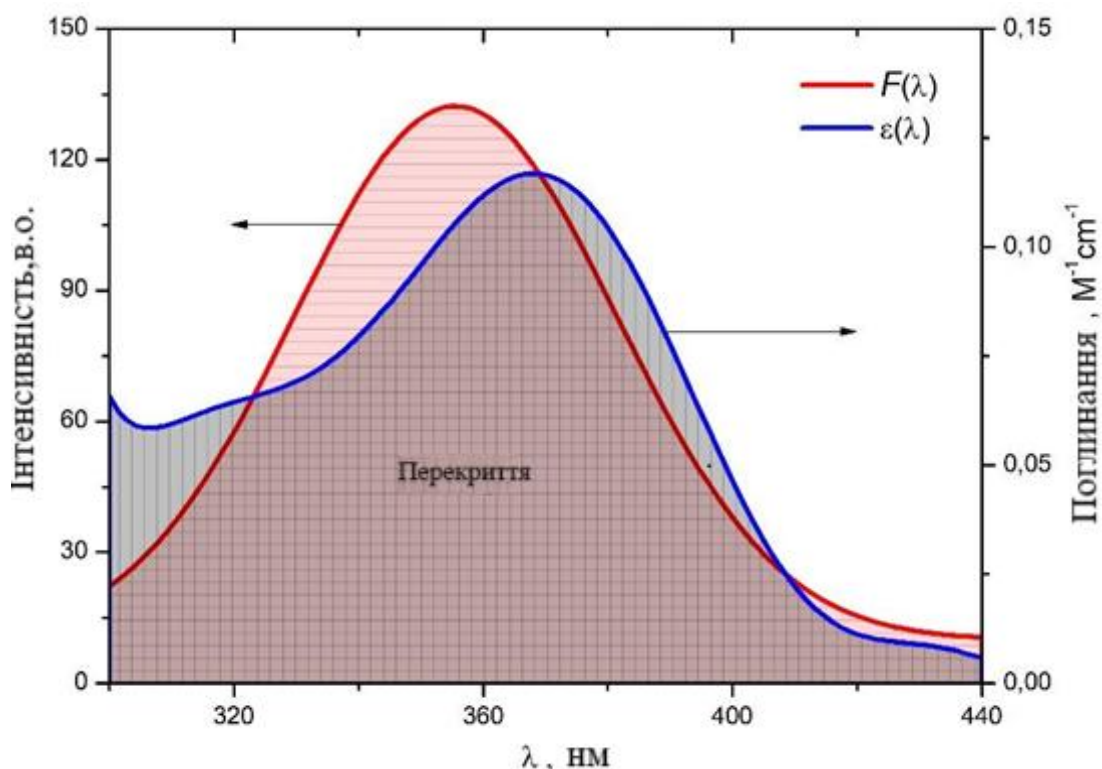


Рис.5.9. Перекриття спектрів емісії флуоресценції водного розчину БСА ( $C_{\text{БСА}}=2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) та поглинання кверцетину ( $C_{\text{Q}}=2.5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ) при 293 K.

Виходячи з отриманих даних, значення  $J \approx 1.417 \times 10^9 \text{ нм}^4 \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , а значення  $R_0 \approx 1,24 \text{ нм}$ ,  $r \approx 4,75 \text{ нм}$  для кверцетину. Середня відстань між донорським флуорофором та акцептором флуорофором за шкалою від 2 до 8 нм, що вказує на те, що передача енергії від БСА до кверцетину відбулася з великою ймовірністю.

На рис.5.10 показано перекриття спектрів емісії флуоресценції водного розчину БСА та поглинання куркуміну при температурі 293 К.



Рис. 5.10. Перекриття спектра випромінювання донора (БСА) ( $C_{\text{БСА}}=2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ ) і спектра поглинання акцептора (куркуміну) ( $C_{\text{Куркумін}}=4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ ) при температурі 293 К.

З перекриття спектрів встановлено значення  $J \approx 3,833 \times 10^8 \text{ нм}^4 \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для куркуміну. Далі, використовуючи формули (2) і (3) отримуємо значення  $R_0 \approx 1 \text{ нм}$  та  $r \approx 1,23 \text{ нм}$  для куркуміну.

Розраховані для системи БСА-куркумін значення термодинамічних характеристик показані у табл. 5.6. Негативні значення вільної енергії ( $\Delta G$ ) свідчать про спонтанність всіх процесів зв'язування.

Таблиця 5.6

## Термодинамічні характеристики розчинів БСА-куркумін

Термодинамічні параметри			
T(K)	$\Delta G (\times 10^3 \text{ Дж/моль})$	$\Delta S (\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H (\times 10^3 \text{ Дж/моль})$
293	-38,12	370,13	70,32
303	-42,73	373,13	
313	-45,5	370,06	

Зміна ентальпії  $\Delta H$  і зміна ентропії  $\Delta S$  є позитивними, що вказує на типові гідрофобні взаємодії.

### 5.3. Комп'ютерне моделювання БСА-кверцетин та БСА-куркумін

З моделювання комплексів знайдена найоптимальніша з енергетичної точки зору структура комплексу, показана на рис.5.11. Молекула Кверцетин розташовується у зв'язувальній кишені БСА в оточенні як гідрофобних, так і полярних амінокислотних залишків (див. рис. 5.1 (б)). Енергія зв'язування молекул у комплексі  $\Delta G \approx -30.37 \text{ kJ/mol}$ , що добре узгоджується з величиною встановленою з експериментальних даних за нормальних умов, враховуючи похибки вимірів та методу моделювання. Зв'язування є порівняно сильним, комплексоформуючими силами в результаті докінг-моделювання в AutoDock 4.2 є ван-дер-ваальсівська, гідрофобна взаємодії та водневі зв'язки. Детальніший аналіз внесків різних взаємодій у процес зв'язування проведений в результаті моделювання молекулярної динаміки.

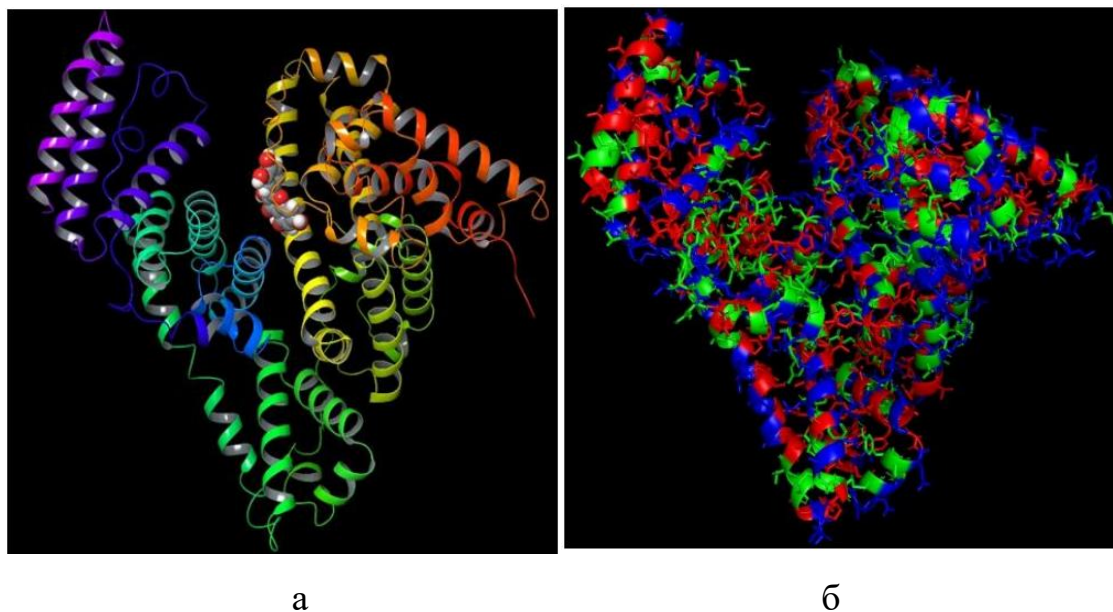


Рис.5.11. Оптимальна мода зв'язування БСА та кверцетину (а) та розміщення гідрофобних (червоний колір), полярних незаряджених (зелений колір) і заряджених (синій колір) залишків амінокислот в біомолекулі БСА (б).

Найоптимальніша з енергетичної точки зору структура комплексу приведена на рис. 5.11 (а). Молекула кверцетину розташовується у зв'язувальній кишені БСА в оточенні як гідрофобних, так і полярних амінокислотних залишків (див. рис. 5.11 (б)). Енергія зв'язування молекул у комплексі  $\Delta G \approx -30.37$  kJ/mol, що добре узгоджується з величиною встановленою з експериментальних даних за нормальних умов, враховуючи похибки вимірів та методу моделювання. Зв'язування є порівняно сильним, комплексоформуючими силами в результаті докінг-моделювання в AutoDock 4.2 є ван-дер-ваальсівська, гідрофобна взаємодія та водневі зв'язки. Детальніший аналіз внескірізних взаємодій у процес зв'язування проведений в результаті моделювання молекулярної динаміки.

На рис. 5.12 (а) вказане локальне амінокислотне оточення молекули кверцетину, що включає залишки Leu-189, Asp-108, Ser-109, Pro-110, Asp-111, Leu-112, ARG-144, His-145, Pro-146, Tyr-147, Ser-192, Ala-193, Arg-194, Arg-198, Glu-424, Arg-458 та Leu-462.

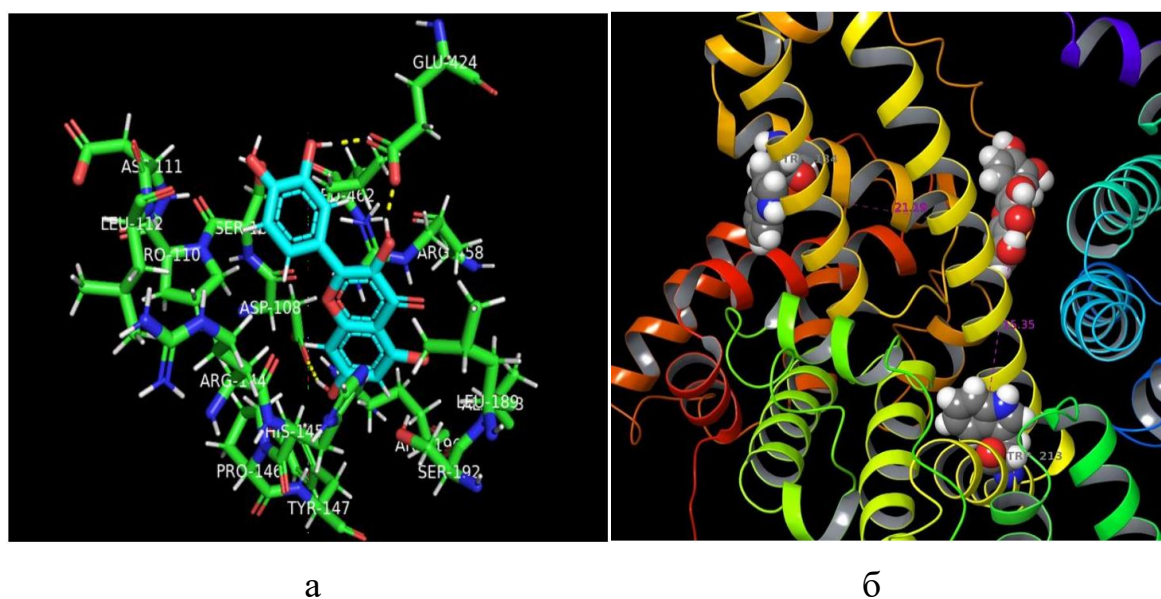


Рисунок 5.12. Найближче оточення амінокислотних залишків БСА на відстані до 4 Å навколо молекули кверцетину (жовтим пунктиром вказані водневі зв'язки) (а) та розташування молекули кверцетину відносно флуоресцентних триптофанових амінокислотних залишків Trp-213 і Trp-134 ( відстань вказана в Å) (б).

Інтенсивність взаємодії кверцетину з даними залишками проаналізована в результаті моделювання молекулярної динаміки. На рис. 5.12 (б) зазначені відстані від молекули кверцетину до флуоресцентних триптофанових амінокислотних залишків Trp-134 та Trp-213 молекули БСА. Отримані з докінгу значення 2.12 нм та 1.54 нм відповідно добре узгоджуються з отриманим середнім значенням з теорії Фьорстера. Детальніше, які саме атомні групи Кверцетин взаємодіють з локальним оточенням молекули БСА приведено на рис.5.13, де вказані ті залишки, взаємодія з якими становить не менше 10% від загальної взаємодії кверцетину з БСА. Відсотками вказані внески кожного амінокислотного залишку у загальну енергію взаємодії кверцетину з БСА в області зв'язування. Найсильнішим є зв'язування з Asp-108. Відповідними кольорами вказані типи взаємодій з тими чи іншими зарядженими, полярними або гідрофобними амінокислотними залишками.

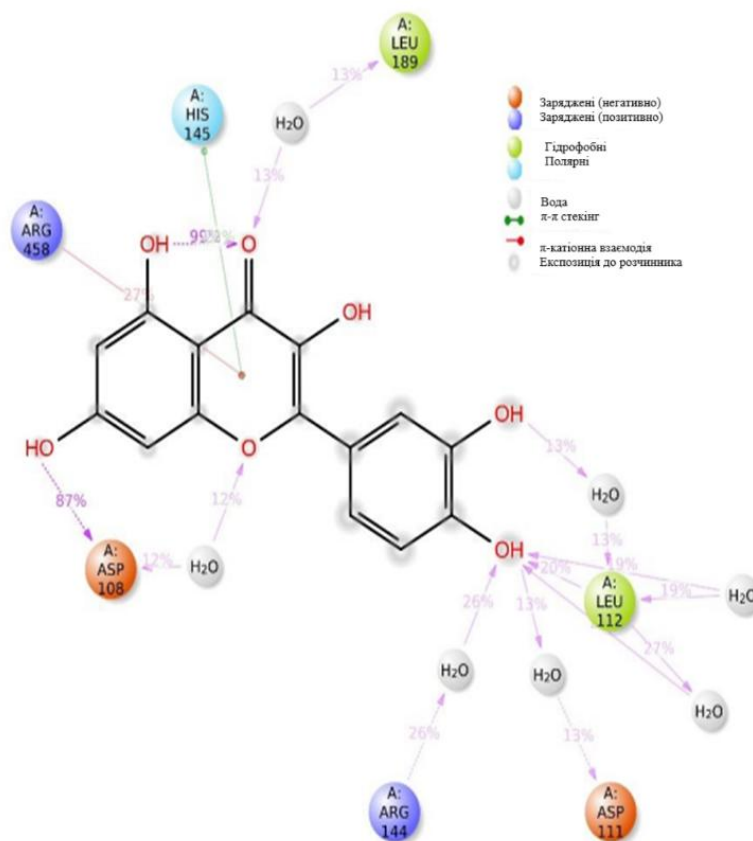


Рис.5.13. Типи взаємодій кверцетину з найближчим амінокислотним оточенням місці зв'язування.

Найінтенсивнішою виявляється взаємодія з зарядженими Asp-108 та Arg-458, полярним His-145 та гідрофобним Leu-112 амінокислотними залишками. Роль гідрофобного контакту проявляється з Arg-458 та в утвореному π-π зв'язку з His-145. Водневі зв'язки найкраще проявляються з Asp-108 та Leu-12. Суттєвою у процесі комплексоутворення є роль водних містків (water bridges), за посередності яких також здійснюється водневе зв'язування кверцетину з амінокислотним оточенням БСА.

На рис.5.14 показана гідрофобність взаємодії та місця водневих зв'язків.

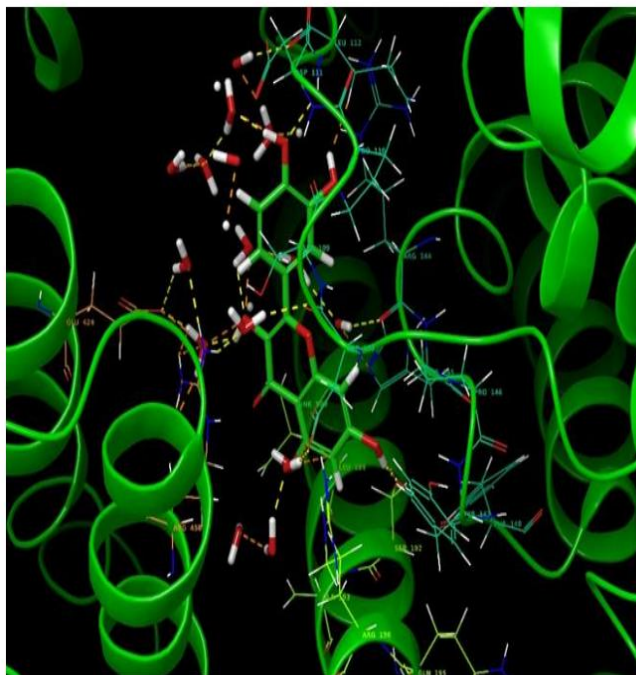


Рис.5.14. Гідрофобний ефект та водневі зв'язки як головні комплексоформуючі сили. Жовтим пунктиром відмічено водневі зв'язки. Біло-червоним позначені молекули води. Таким чином, головними силами у процесі утворення стійкого комплексу БСА- Кверцетин водневі зв'язки та гідрофобна взаємодія.

Для встановлення механізмів зв'язування куркуміну з БСА та енергії їхнього зв'язку в комплексі, стабільності утвореного молекулярного комплексу у водному розчиннику застосовували методи молекулярного докінгу та моделювання молекулярної динаміки (146–148). У рамках моделювання враховували лише слабкі сили взаємодії молекул у комплексах: електростатичні, ван-дер-ваальсові, водневі зв'язки та гідрофобну взаємодію (зокрема,  $\pi$ - $\pi$  - укладання та  $\pi$ -катіонну взаємодію).

Повний заряд молекули БСА становить -17 е. Структуру молекули БСА вважали жорсткою. На рисунку 5.15 представлено молекулу БСА із зазначеною вторинною структурою та доменами, а також молекулярну поверхню молекули з позначеними ділянками полярності та гідрофобності, разом з відповідними амінокислотними залишками.

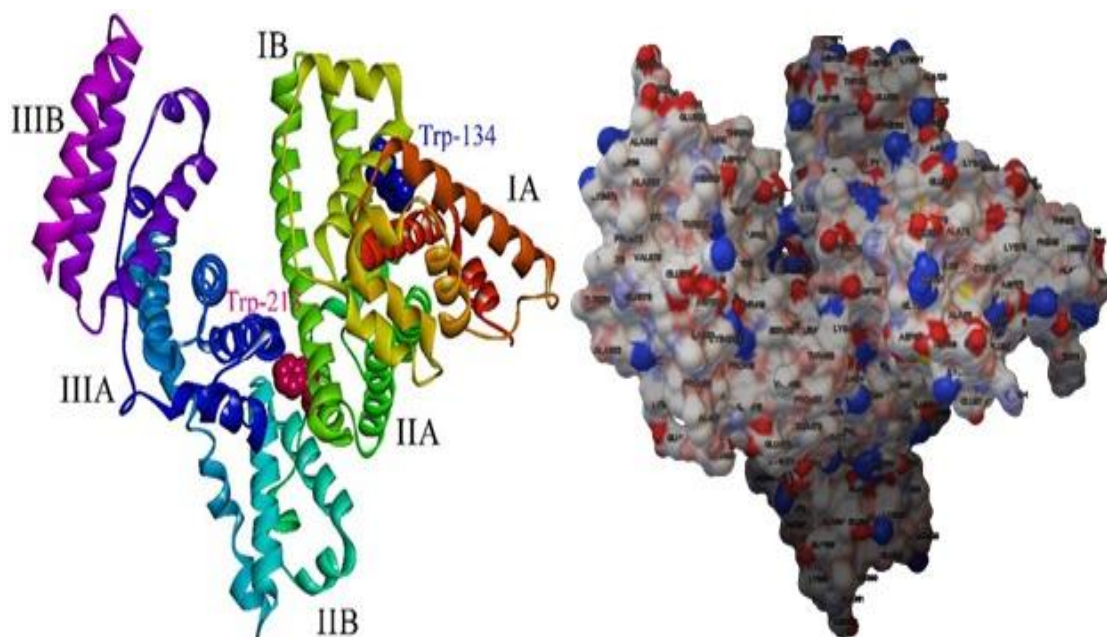


Рис.5.15. Молекула БСА з вказаними доменами та двома триптофановими амінокислотними залишками Trp-134 та Trp-213 (а); молекула куркуміну  $C_{21}H_{20}O_6$  з зазначеними кольором поворотними зв'язками (б).

Парціальні заряди на атомах молекули куркуміну були розраховані за допомогою методу Гастейгера. Молекулярна структура містить 10 обертових зв'язків, що дозволяє аналізувати зв'язуючі взаємодії між різними конформаціями сполуки та БСА (див. рис. 5.16).

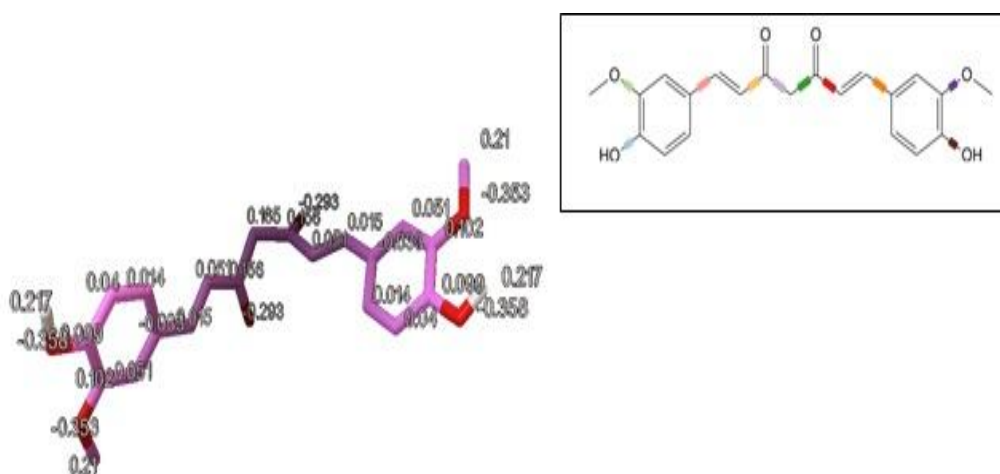


Рис.5.16. Молекула куркуміну  $C_{21}H_{20}O_6$  із зазначеними парціальними зарядами та позначеними кольором поворотними зв'язками

В результаті моделювання було отримано 100 режимів зв'язування, які були згруповані в декілька кластерів. Енергії зв'язування  $\Delta G$  отриманих форм коливалися від -31,3 кДж/моль до -11,38 кДж/моль. На рис.5.17 показано перші чотири кластери. На основі експериментальних даних, отриманих з флуоресцентної спектроскопії розчинів (теорії Ван Гоффа і Ферстера), найбільш релевантними результатами докінгу є кластери з найбільшою кількістю конформацій.

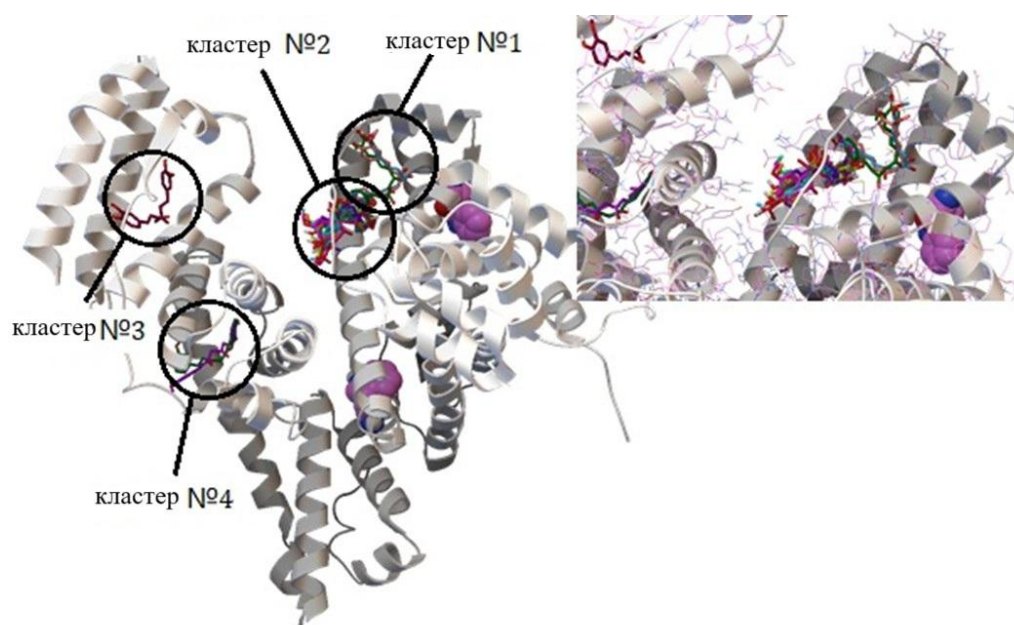


Рис.5.17. Перші чотири кластери зв'язування БСА та куркуміну, а також два найсприятливіші кластери (на підписунку), що містять 3 та 8 конформацій відповідно.

Тому, перші два кластери, з 3 і 8 конформаціями відповідно, показані у збільшеному вигляді на рис.5.18. Ці конформації визначено як найбільш енергетично вигідні шляхом повторних процедур докінгу. Крім того, моди кластерів №1 і №2 розташовані близько до амінокислотного залишку триптофану і мають майже однакові значення енергії зв'язку. Таким чином, детальне представлення сайту зв'язування та водневих зв'язків, що утворюються з найближчим амінокислотним оточенням, показано на рисунку 5.18.

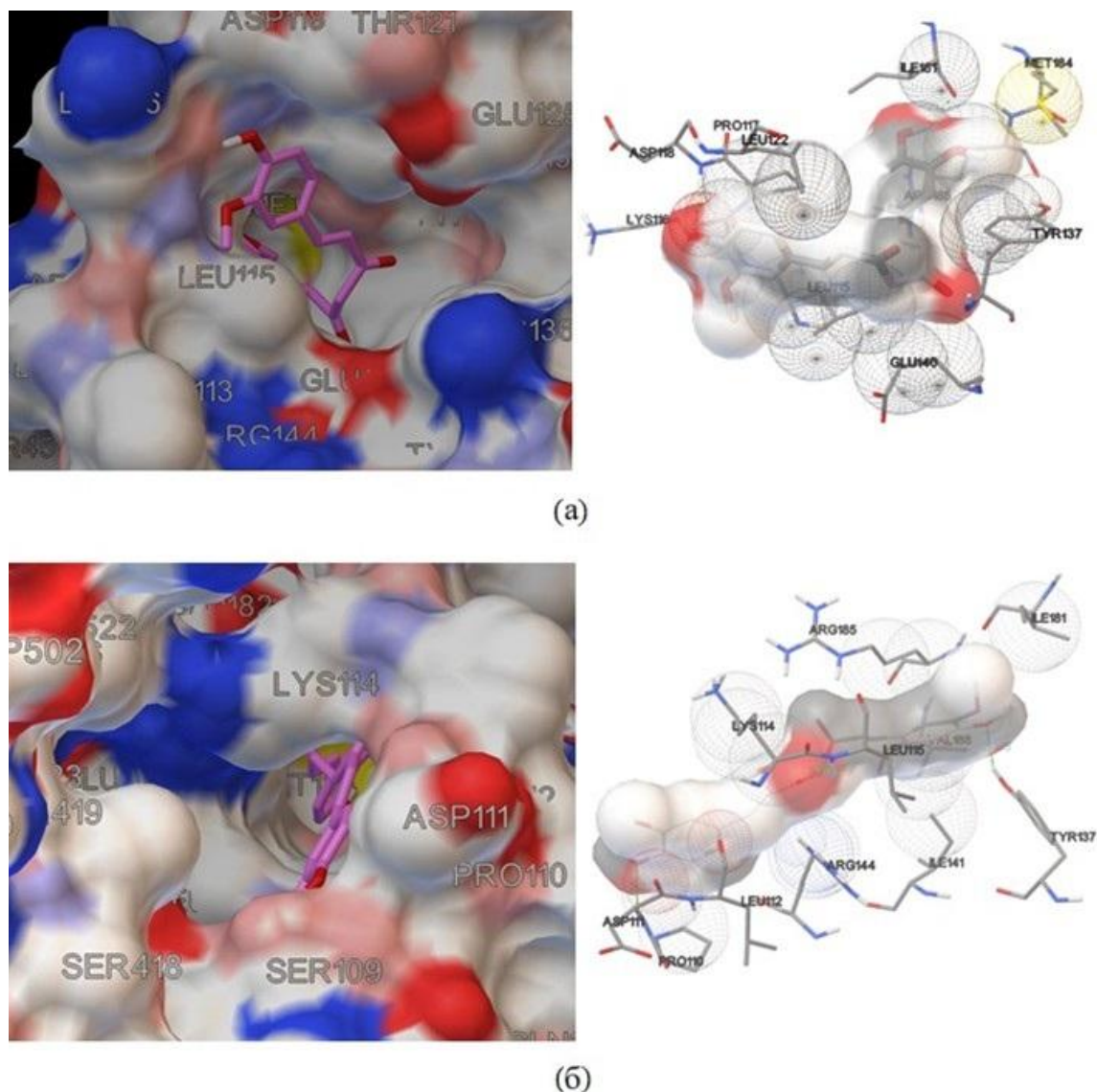


Рис.5.18. Ділянки зв'язування із зазначеними полярними областями та встановленими водневими зв'язками з найближчим амінокислотним оточенням для найбільш оптимальних конформаційних кластерів і найміцнішого зв'язування.

Перший кластер на рис.5.18 представлений трьома конформаціями з найнижчою енергією зв'язку  $-31,3$  кДж/моль. Електростатична складова близька до нуля, оскільки в гідрофобній кишені в субдоміні ІА немає заряджених полярних залишків (рис.5.19 (а)). Водневі зв'язки утворюються з Ile181 та Asp118, тоді як гідрофобні взаємодії включають Val188, Met184, Leu122, Tyr160, Pro117, Ile181, Phe133. Для другого кластера гідрофобне

оточення представлене Phe141, Tyr137, Phe181, Leu112, Leu115, Pro110 (див. рис.5.19(б)). Загальна енергія зв'язку дещо нижча. Однак внесок електростатичних взаємодій відрізняється за рахунок взаємодії між негативно зарядженими атомами кисню в центрі молекули куркуміну (див. рис.5.16) і позитивно зарядженим Arg185. Водневі зв'язки утворюються з Leu115, Tyr137 та Asp111. Перший конформаційний кластер виявляється найоптимальнішим при повторних процедурах докінгу і характеризується близькістю до залишків триптофану, що робить цю конфігурацію фокусом для подальших досліджень молекулярної динаміки (149–152).

Енергії зв'язування, отримані в результаті експериментального дослідження, коливаються від -35 до -45 кДж/моль, залежно від температури, тоді як моделювання докінгу дало енергію зв'язування приблизно -31 кДж/моль для найкращого режиму зв'язування. Константа зв'язування, визначена експериментально, відображає повну взаємодію, включаючи рух молекул води та зміни конформації білка. Моделювання докінгу передбачає відносно жорсткі білок і ліганд і нехтує впливом розчинника в явному вигляді, особливо в моделях з неявним розчинником. Таким чином, оцінка докінгу, як правило, недооцінює загальну вільну енергію зв'язування, оскільки не враховує внесок ентропійних змін (наприклад, витіснення розчинником, конформаційну гнучкість).

На рис. 5.19 показано амінокислотні залишки з найближчого оточення молекули препарату.

Найдовші (або найчастіші) зв'язки куркуміну встановлені з гідрофобними Leu-115, Pro-117, Leu-122, Phe-133, Phe-141, Tyr-160, негативно зарядженими Arg-185, Lys-136 та позитивно зарядженими Glu-125, Glu-140 і Glu-182, зокрема, з утвореним  $\pi$ -катіонним зв'язком ароматичного кільця куркуміну з Arg-185. Більшість амінокислотних залишків є гідрофобними, і, таким чином, експериментальний висновок

про переважання гідрофобної взаємодії в процесі комплексоутворення підтверджується результатами моделювання.

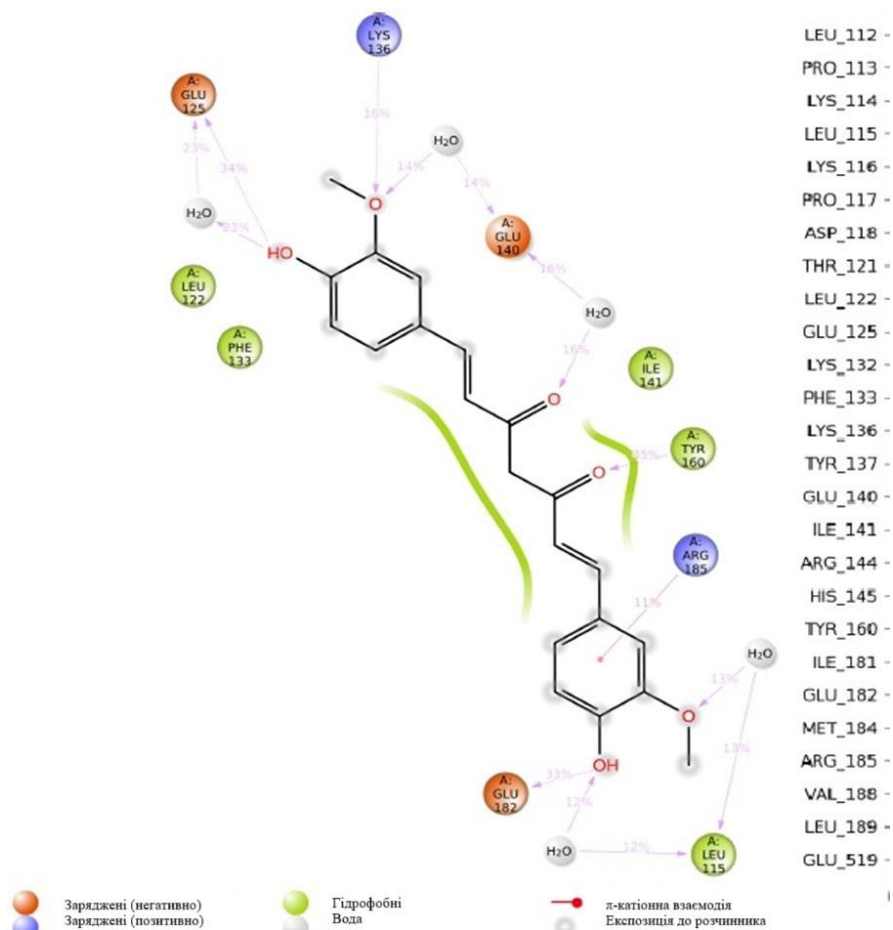


Рис. 5.19. Аналіз взаємодії куркуміну з найближчим амінокислотним оточенням

З представлених результатів можна зробити висновок про основну роль гідрофобної взаємодії при незначному внеску водневих зв'язків у комплексоутворення. Результат моделювання доповнює та уточнює отримані дані термодинамічних характеристик взаємодії молекул з теорії Хілла (129).

## Висновки до розділу 5

1. Результати флуоресцентного спектрального аналізу водних розчинів БСА-кверцетин при різних температурах вказують на статичний механізм гасіння інтенсивності флуоресценції, який супроводжується утворенням стабільних молекулярних комплексів. Цей висновок підтверджується результатами молекулярного моделювання докінгу та динаміки. Зв'язування у комплексі є відносно сильним, з енергією приблизно  $-30$  кДж/моль, а кількість зв'язувальних центрів наближається до одиниці. Основними силами, що сприяють утворенню комплексу, є водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії, що підтверджується результатами спектральних досліджень і молекулярне моделювання.
2. Було визначено місце зв'язування білка з молекулами лікарського засобу в комплексі, де, зокрема, найбільш значущими є взаємодії з амінокислотними залишками Asp-108, Leu-112, His-145 та Arg-458. Крім того, було визначено відстані від кверцетину до двох флуоресцентних амінокислотних залишків Trp-134 і Trp-213 молекули БСА, які становлять приблизно 2 нм і 1,5 нм відповідно. Ці значення добре узгоджуються із середнім значенням, встановленим за теорією Фьостера для аналізу флуоресцентних та абсорбційних спектрів водних розчинів БСА-кверцетин і кверцетину, відповідно.
3. Моделювання молекулярної динаміки у водному середовищі підтверджує тимчасову стабільність комплексів та незначні конформаційні зміни молекули БСА під час взаємодії, що також відображається у флуоресцентних спектрах водних розчинів досліджуваних компонентів.
4. Результати комплексного експериментального та теоретичного дослідження взаємодії БСА з кверцетином можуть бути використані дослідниками у сфері біомедичного застосування антиоксидантних

препаратів з метою їх більш ефективного використання в медичній практиці, зокрема для їх цільової доставки до уражених тканин завдяки зв'язуванню з біомолекулами білків крові.

5. У водних розчинах БСА з лікарським препаратом куркуміном було виявлено значне гасіння випромінювання та збудження флуоресценції зі збільшенням концентрації куркуміну при температурах 293 К, 303 К і 313 К. Отримані значення констант Штерна-Фольмера  $K_{SV}$  та  $K_q$  для різних температур вказують на те, що гасіння відбувається внаслідок утворення комплексів БСА-куркумін у основному стані.
6. Зі зростанням температури структура білка стає більш гнучкою, що підсилює гідрофобні контакти та відкриває більше гідрофобних ділянок для зв'язування куркуміну. Про більш сильне зв'язування при вищих температурах свідчить зростання константи асоціації  $K_A$ .
7. Гасіння флуоресценції відбувається через передачу енергії від флуорофорів-донорів БСА (переважно залишків Trp-134 і Trp-213) до лікарського препарату (акцептору) за механізмом FRET (резонансний перенос енергії за Фьостером). Використання теорії Фьостера для FRET дозволило визначити відстань між донором і акцептором:  $R_0 \approx 1$  нм і  $r \approx 1.23$  нм для куркуміну, що підтверджується результатами моделювання комплексів методом молекулярного докінгу.
8. Зв'язування молекул у комплексі є сильним (енергія зв'язування для даних режимів  $\Delta G \approx -45 \div -35$  кДж/моль), а кількість зв'язувальних центрів наближається до одиниці, що вказує на наявність єдиного сайту зв'язування для молекули куркуміну.
9. Детальний аналіз взаємодії за допомогою методів молекулярного моделювання також показує значний внесок гідрофобної взаємодії у формування комплексу БСА-куркумін з незначним внеском водневих зв'язків.

## ВИСНОВКИ

1. Дослідження гасіння флуоресценції фізіологічних розчинів БСА- $\text{CeO}_2$  при малих розмірах наночастинок діоксиду церію  $d = 3-4$  нм та застосування теорії Штерна-Вольмера показують статичний характер комплексоутворення, яке відбувається за значної величини константи зв'язування  $\lg K_A = 7,83$  та числі місць зв'язування  $n = 1,97$ .

2. Використання теорії Фьорстера показує, що середня відстань між залишками амінокислот триптофану та наночастинами  $\text{CeO}_2$  складає  $r \approx 6,1$  нм, що перевищує отримане значення в результаті комп'ютерного моделювання.

3. Розрахунки термодинамічних характеристик для комплексів БСА- $\text{CeO}_2$  показують, що основний внесок у формуванні гетероасоціатів визначається ван-дер-ваальсовською взаємодією та водневими зв'язками.

4. В результаті докінг-моделювання встановлені моди зв'язування та найближче оточення амінокислотних залишків БСА навколо  $\text{CeO}_2$ .

5. З розрахунків параметрів зв'язування, що отримані з гасіння флуоресценції, та застосуванні теорії Хілла для розчинів у воді ЛСА-кверцетин та ЛСА-куркумін показують, що величина константи зв'язування в комплексах з куркуміном  $\lg K_A = 6,14$  при числі місць зв'язування  $n = 1,065$  перевищує аналогічне значення у випадку гетероасоціату з кверцетином  $\lg K_A = 5,29$ ,  $n = 0,94$ .

6. Визначено термодинамічні параметри, з яких встановлено, що в комплексах ЛСА з куркуміном і кверцетином основну роль відіграють водневі зв'язки, що узгоджується з результатами комп'ютерного моделювання за різного оточення ліків залишками амінокислот, які додатково приводять до появи гідрофобної та  $\pi$ - $\pi$ -стекінг взаємодій.

7. Показано, що константа зв'язування для розчину у воді БСА-куркумін  $\lg K_A = 6,8$ , ( $n = 1,119$ ) перевищує відповідне значення

зв'язування в комплексі ЛСА-куркумін на відміну від константи зв'язування для розчину у воді БСА-кверцетин  $\lg K_A = 4,56$ , ( $n = 0,83$ ), яке є істотно меншим в порівнянні з подібним параметром гетеросоціата ЛСА-кверцетин.

8. Порівняння отриманих значень термодинамічних характеристик для розчинів у воді БСА з куркуміном і кверцетином показує, що в комплексах БСА-куркумін має місце гідрофобна взаємодія, а в гетеросоціатах БСА-кверцетин основну роль відіграє водневий зв'язок, як і для комплексів ЛСА з відповідними ліками.

9. Розрахунки при застосуванні методу молекулярної динаміки показують, що для комплексів БСА-куркумін реалізується взаємодія з гідрофобними залишками Leu-115, Pro-117, Leu-122 та Phe-133, а для комплексів БСА-кверцетин ключову роль відіграють водневі зв'язки з Asp-108 та  $\pi$ - $\pi$  стекінг з His-145.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Poór M, Boda G, Kunsági-Máté S, Needs PW, Kroon PA, Lemli B. Fluorescence spectroscopic evaluation of the interactions of quercetin, isorhamnetin, and quercetin-3'-sulfate with different albumins. *J Lumin.* 2018;194.
2. Kratz F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release.* 2008 Dec 18;132(3):171–83.
3. Chaves OA, Schaeffer E, Sant'Anna CMR, Netto-Ferreira JC, Cesarin-Sobrinho D, Ferreira ABB. Insight into the interaction between  $\alpha$ -lapachone and bovine serum albumin employing a spectroscopic and computational approach. *Mediterranean Journal of Chemistry.* 2016;5(1):331–9.
4. Waranyoupalin R, Wongnawa S, Wongnawa M, Pakawatchai C, Panichayupakaranant P, Sherdshoopongse P. Studies on complex formation between curcumin and Hg(II) ion by spectrophotometric method: A new approach to overcome peak overlap. *Central European Journal of Chemistry.* 2009;7(3).
5. <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>.
6. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68(10).
7. Yue Q, Shen T, Wang C, Gao C, Liu J. Study on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ceftriaxone and the Inhibition Effect of Zinc (II). *Int J Spectrosc.* 2012;2012:1–9.
8. Iosin M, Canpean V, Astilean S. Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2011;217(2–3).

9. Tang X, Tang P, Liu L. Molecular structure–Affinity relationship of Flavonoids in Lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) on Binding to Human serum albumin and Bovine serum albumin by Spectroscopic Method. *Molecules*. 2017;22(7).
10. Tian J, Liu J, Zhang J, Hu Z, Chen X. Fluorescence studies on the interactions of barbaloin with bovine serum albumin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003;51(5).
11. Cortez CM, Silva D, Silva CMC, Missailidis S. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2012;95.
12. Deepa S, Mishra AK. Fluorescence spectroscopic study of serum albumin-bromadiolone interaction: Fluorimetric determination of bromadiolone. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;38(3).
13. Yang G De, Li C, Zeng AG, Zhao Y, Yang R, Bian XL. Fluorescence spectroscopy of osthole binding to human serum albumin. *J Pharm Anal*. 2013;3(3).
14. Silva D, Cortez CM, Louro SRW. Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(7):963–8.
15. De Araújo Motta AAE, Grassini MCV, Cortez CM, Silva D. A model to estimate the relative position of sites for ligands in serum albumins. In: *AIP Conference Proceedings*. 2017.
16. Dehghan Niestanak V, Unsworth LD. Detailing Protein-Bound Uremic Toxin Interaction Mechanisms with Human Serum Albumin in the Pursuit of Designing Competitive Binders. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. 2023.
17. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992;358(6383):209–15.

18. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol.* 2003;3.
19. Lettieri M, Palladino P, Scarano S, Minunni M. Protein-templated copper nanoclusters for fluorimetric determination of human serum albumin. *Mikrochim Acta.* 2021;188(4).
20. Li C, Zhang D, Pan Y, Chen B. Human Serum Albumin Based Nanodrug Delivery Systems: Recent Advances and Future Perspective. Vol. 15, *Polymers.* 2023.
21. Chaves OA, Ana AP, Castro LHE, Sant'anna CMR, De Oliveira MCC, Cesarin-Sobrinho D, et al. Fluorescence and docking studies of the interaction between human serum albumin and pheophytin. *Molecules.* 2015;20(10):19526–39.
22. M H, Azzazy E, Christenson RH. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications.* Theodore Peters, Jr. San Diego, CA: Academic Press, 1996, 432 pp, \$85.00. ISBN 0-12-552110-3. *Clin Chem.* 1997;43(10).
23. Cheng LY, Xia W, Zhang X, Bai AM, Ouyang Y, Hu YJ. In vitro binding comparison of cephalosporins to human serum albumin by spectroscopy and molecular docking approaches: A novel structural pursuing. *J Mol Liq.* 2017 Dec 1;248:168–76.
24. Tian J, Shi Z, Wang G. Thermodynamic and Kinetic Binding Behaviors of Human Serum Albumin to Silver Nanoparticles. *Materials.* 2022;15(14).
25. Patar M, Jalan A, Moyon NS. A Fluorescence and Molecular Docking Study on the Interaction of 4'-Hydroxychalcone with Bovine Serum Albumin and Human Serum Albumin. *Asian Journal of Chemistry.* 2022;34(7).
26. Kandagal PB, Ashoka S, Seetharamappa J, Shaikh SMT, Jadegoud Y, Ijare OB. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine

- serum albumin: Spectroscopic approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(2).
27. Li X, Yang Z. Interaction of oridonin with human serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2015;232(March):77–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.012>
  28. Jiang CQ, Gao MX, Meng XZ. Study of the interaction between daunorubicin and human serum albumin, and the determination of daunorubicin in blood serum samples. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2003 May;59(7):1605–10.
  29. Xie MX, Long M, Liu Y, Qin C, Wang YD. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2006;1760(8).
  30. Cheng LY, Xia W, Zhang X, Bai AM, Ouyang Y, Hu YJ. In vitro binding comparison of cephalosporins to human serum albumin by spectroscopy and molecular docking approaches: A novel structural pursuing. *J Mol Liq.* 2017;248.
  31. Ploch-Jankowska A, Pentak D, Nycz JE. A comprehensive spectroscopic analysis of the ibuprofen binding with human serum albumin, part ii. *Sci Pharm.* 2021;89(3).
  32. Wani TA, Bakheit AH, Ansari MN, Al-Majed ARA, Al-Qahtani BM, Zargar S. Spectroscopic and molecular modeling studies of binding interaction between bovine serum albumin and roflumilast. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12.
  33. Barbezan AB, Rosero WAA, Vieira DP, Rigo MEZ, Silva GD da, Rodrigues AA, et al. Radioactive gold nanoparticles coated with BSA: A promising approach for prostate cancer treatment. *Nanotheranostics.* 2024;8(1).

34. Khmil N V., Kolesnikov VG. Molecular Docking Of Human Serum Albumin With Penicillin G Determinants. *Biophysical Bulletin*. 2023;2023(49).
35. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. 2009;5(24).
36. Bellio P, Luzi C, Mancini A, Cracchiolo S, Passacantando M, Di Pietro L, et al. Cerium oxide nanoparticles as potential antibiotic adjuvant. Effects of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on bacterial outer membrane permeability. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018;1860(11).
37. Walkey C, Das S, Seal S, Erlichman J, Heckman K, Ghibelli L, et al. Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. Vol. 2, *Environmental Science: Nano*. 2015.
38. Eskandari N, Babadaei MMN, Nikpur S, Ghasrahmad G, Attar F, Heshmati M, et al. Biophysical, docking, and cellular studies on the effects of cerium oxide nanoparticles on blood components: In vitro. *Int J Nanomedicine*. 2018;13.
39. Shcherbakov AB, Zholobak NM, Ivanov VK. Biological, biomedical and pharmaceutical applications of cerium oxide. In: *Cerium Oxide (CeO<sub>2</sub>): Synthesis, Properties and Applications*. 2019.
40. Shcherbakov AB, Ivanov VK, Zholobak NM, Ivanova OS, Krysanov EY, Baranchikov AE, et al. Nanocrystalline ceria based materials-Perspectives for biomedical application. Vol. 56, *Biophysics*. 2011.
41. Sridharan M, Kamaraj P, Vennilaraj, Arockiaselvi J, Pushpamalini T, Vivekanand PA, et al. Synthesis, characterization and evaluation of biosynthesized Cerium oxide nanoparticle for its anticancer activity on breast cancer cell (MCF 7). In: *Materials Today: Proceedings*. 2019.

42. Wason MS, Zhao J. Cerium oxide nanoparticles: Potential applications for cancer and other diseases. Vol. 5, American Journal of Translational Research. 2013.
43. Alili L, Sack M, Von Montfort C, Giri S, Das S, Carroll KS, et al. Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(8).
44. Wang X, Wu J, Wang J, Xiao H, Chen B, Peng R, et al. Methanol plasma-catalytic oxidation over CeO<sub>2</sub> catalysts: Effect of ceria morphology and reaction mechanism. *Chemical Engineering Journal*. 2019;369.
45. Sudarshan K, Sharma SK, Gupta R, Gupta SK, Sayed FN, Pujari PK. Role of surface defects in catalytic properties of CeO<sub>2</sub> nanoparticles towards oxygen reduction reaction. *Mater Chem Phys*. 2017;200.
46. Luňáček J, Životský O, Janoš P, Došek M, Chrobak A, Maryško M, et al. Structure and magnetic properties of synthesized fine cerium dioxide nanoparticles. *J Alloys Compd*. 2018;753.
47. M Farahmandjou, M Zarinkamar TF. Synthesis of Cerium Oxide (CeO<sub>2</sub>) nanoparticles using simple CO-precipitation method. *Rev Mex Fis*. 2016;62.
48. Manoharan D, Vishista K. Optical properties of nano-crystalline cerium dioxide synthesized by single step aqueous citrate-nitrate gel combustion method. *Asian Journal of Chemistry*. 2013;25(16).
49. Calvache-Muñoz J, Prado FA, Tirado L, Daza-Gomez LC, Cuervo-Ochoa G, Calambas HL, et al. Structural and Optical Properties of CeO<sub>2</sub> Nanoparticles Synthesized by Modified Polymer Complex Method. *J Inorg Organomet Polym Mater*. 2019;29(3).
50. Khan H, Ullah H, Aschner M, Cheang WS, Akkol EK. Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer's disease. Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020.

51. Amorati R, Baschieri A, Cowden A, Valgimigli L. The antioxidant activity of quercetin in water solution. *Biomimetics*. 2017 Sep 1;2(3).
52. Baghel SS, Shrivastava N, Singh R, Agrawal BP, Rajput S. a Review of Quercetin : Antioxidant and Anticancer Properties. *World J Pharm Pharm Sci*. 2012;1(1).
53. Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. Vol. 121, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2020.
54. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. Vol. 24, *Molecules*. MDPI AG; 2019.
55. Azeem M, Hanif M, Mahmood K, Ameer N, Chughtai FRS, Abid U. An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. Vol. 80, *Polymer Bulletin*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 241–62.
56. Hatahet T, Morille M, Shamseddin A, Aubert-Pouëssel A, Devoisselle JM, Bégu S. Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide. *Int J Pharm*. 2017;518(1–2).
57. Lin X, Lin CH, Zhao T, Zuo D, Ye Z, Liu L, et al. Quercetin protects against heat stroke-induced myocardial injury in male rats: Antioxidative and antiinflammatory mechanisms. *Chem Biol Interact*. 2017;265.
58. Guss KL, Pavanni S, Prati B, Dazzi L, de Oliveira JP, Nogueira B V., et al. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline satureioides* prevents contrast-induced nephropathy in mice. *Ultrason Sonochem*. 2017;37.
59. Granato M, Rizzello C, Montani MSG, Cuomo L, Vitillo M, Santarelli R, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion

- lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017;41.
60. Milanezi FG, Meireles LM, de Christo Scherer MM, de Oliveira JP, da Silva AR, de Araujo ML, et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of gold nanoparticles capped with quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(7).
  61. Zhang C, Korshin G V., Kuznetsov AM, Yan M. Experimental and quantum-chemical study of differential absorbance spectra of environmentally relevant species: A study of quercetin deprotonation and its interactions with copper (II)ions. *Science of the Total Environment*. 2019;679.
  62. Halevas E, Mavroidi B, Pelecanou M, Hatzidimitriou AG. Structurally characterized zinc complexes of flavonoids chrysin and quercetin with antioxidant potential. *Inorganica Chim Acta*. 2021;523.
  63. Corrente GA, Malacaria L, Beneduci A, Furia E, Marino T, Mazzone G. Experimental and theoretical study on the coordination properties of quercetin towards aluminum(III), iron(III) and copper(II) in aqueous solution. *J Mol Liq*. 2021;325.
  64. El-Bindary AA, Anwar ZM, El-Shafaie T. Effect of some amino acids on the binding of quercetin and rutin flavonoids with DNA. *J Mol Liq*. 2021;334.
  65. Prasanthan P, Kishore N. Self-assemblies of pluronic micelles in partitioning of anticancer drugs and effectiveness of this system towards target protein. *RSC Adv*. 2021;11(36).
  66. Khalin I, Heimburger D, Melnychuk N, Collot M, Groschup B, Hellal F, et al. Ultrabright Fluorescent Polymeric Nanoparticles with a Stealth Pluronic Shell for Live Tracking in the Mouse Brain. *ACS Nano*. 2020;14(8).

67. Kelly GS. Quercetin, *Alternative Medicine Review (AMR)*. Dictionary of Gems and Gemology. 2011;16(2).
68. 2D Structure Quercetin [Internet]. [cited 2025 Jan 18]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=2D-Structure&fullscreen=true>
69. 3D Conformer Quercetin [Internet]. [cited 2025 Jan 18]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=3D-Conformer&fullscreen=true>
70. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Vol. 2013, *The Scientific World Journal*. 2013.
71. Taraba A, Szymczyk K. Quercetin and rutin mixtures with alcohols: Spectroscopic and conductometric studies. *J Mol Struct*. 2020;1203.
72. Prutskij T, Deriabina A, Melendez FJ, Castro ME, Trejo LC, Vazquez Leon GD, et al. Concentration-dependent fluorescence emission of quercetin. *Chemosensors*. 2021;9(11).
73. Tønnesen HH, Másson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm*. 2002;244(1–2).
74. Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P. Curcumin and Curcumin-like Molecules: From Spice to Drugs. *Curr Med Chem*. 2013;21(2).
75. Cai W, Zhang B, Duan D, Wu J, Fang J. Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;262(3).
76. Kabeer A, Muhammad Mailafiya M, Danmaigoro A, Abdul Rahim E, Bu Bakar MZA. Therapeutic potential of curcumin against lead-induced toxicity: A review. *Biomedical Research and Therapy*. 2019;6(3).

77. Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. Vol. 1, Redox Biology. 2013.
78. Allegri P, Mastromarino A, Neri P. Management of chronic anterior uveitis relapses: Efficacy of oral phospholipidic curcumin treatment. Long-term follow-up. *Clinical Ophthalmology*. 2010;4(1).
79. Mazzolani F, Togni S. Oral administration of a curcumin-phospholipid delivery system for the treatment of central serous chorioretinopathy: A 12-month follow-up study. *Clinical Ophthalmology*. 2013;7.
80. Kuptniratsaikul V, Dajpratham P, Taechaarpornkul W, Buntragulpoontawee M, Lukkanapichonchut P, Chootip C, et al. Efficacy and safety of *Curcuma domestica* extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: A multicenter study. *Clin Interv Aging*. 2014;9.
81. Panahi Y, Hosseini MS, Khalili N, Naimi E, Simental-Mendía LE, Majeed M, et al. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;82.
82. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Vol. 41, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009.
83. Wright L, Frye J, Gorti B, Timmermann B, Funk J. Bioactivity of Turmeric-derived Curcuminoids and Related Metabolites in Breast Cancer. *Curr Pharm Des*. 2013;19(34).
84. Vera-Ramirez L, Pérez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-Tortosa M, Battino M, Quiles JL. Curcumin and liver disease. *BioFactors*. 2013;39(1).

85. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(2).
86. Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res.* 2002;22(6 C).
87. Lian YT, Yang XF, Wang ZH, Yang Y, Yang Y, Shu YW, et al. Curcumin Serves as a Human Kv1.3 Blocker to Inhibit Effector Memory T Lymphocyte Activities. *Phytotherapy Research.* 2013 Sep;27(9):1321–7.
88. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A review of its effects on human health. Vol. 6, *Foods.* MDPI AG; 2017.
89. Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(13).
90. Mandal S, Banerjee C, Ghosh S, Kuchlyan J, Sarkar N. Modulation of the photophysical properties of curcumin in nonionic surfactant (Tween-20) forming micelles and niosomes: A comparative study of different microenvironments. *Journal of Physical Chemistry B.* 2013;117(23).
91. Tavano L, Mauro L, Naimo GD, Bruno L, Picci N, Andò S, et al. Further evolution of multifunctional niosomes based on pluronic surfactant: Dual active targeting and drug combination properties. *Langmuir.* 2016;32(35).
92. Kaniuk M. Prospects of Curcumin use in Nanobiotechnology. *Biotechnologia Acta .* 2016;9(3):23–36.
93. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Hashemi F, Zabolian A, Saleki H, Bagherian M, et al. Polychemotherapy with curcumin and doxorubicin via biological nanoplateforms: Enhancing antitumor activity. Vol. 12, *Pharmaceutics.* 2020.

94. Mbese Z, Khwaza V, Aderibigbe BA. Curcumin and Its Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Prostate, Colon and Breast Cancers. Vol. 24, *Molecules* (Basel, Switzerland). NLM (Medline); 2019.
95. 3D Conformer Curcumin.
96. Kotan G, Kardaş F, Yokuş ÖA, Akyildirim O, Saral H, Eren T, et al. A novel determination of curcumin via Ru@Au nanoparticle decorated nitrogen and sulfur-functionalized reduced graphene oxide nanomaterials. *Analytical Methods*. 2016;8(2).
97. Murakami Y, Ishii H, Takada N, Tanaka S, Machino M, Ito S, et al. Comparative anti-inflammatory activities of curcumin and tetrahydrocurcumin based on the phenolic O-H bond dissociation enthalpy, ionization potential and quantum chemical descriptor. *Anticancer Res*. 2008;28(2 A).
98. Stockert JC, Del Castillo P, Gómez A, Liorente AR. Fluorescence Reaction of Chromatin by Curcumin. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 1989;44(3–4).
99. Roy D, Dutta S, Maity SS, Ghosh S, Singha Roy A, Ghosh KS, et al. Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins. *J Lumin*. 2012;132(6).
100. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. Vol. 65, *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2006.
101. Lokhande KB, Doiphode S, Vyas R, Swamy KV. Molecular docking and simulation studies on SARS-CoV-2 Mpro reveals Mitoxantrone, Leucovorin, Birinapant, and Dynasore as potent drugs against COVID-19. *J Biomol Struct Dyn*. 2021;39(18).
102. Amirinasab M, Dehestani M. Theoretical aspects of interaction of the anticancer drug cytarabine with human serum albumin. *Struct Chem*. 2023;34(6).

103. Wani TA, Bakheit AH, Abounassif MA, Zargar S. c. *Front Chem.* 2018;6(MAR).
104. Yue Y, Liu J, Fan J, Yao X. Binding studies of phloridzin with human serum albumin and its effect on the conformation of protein. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2011;56(2):336–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2011.05.018>
105. Calderaro A, Maugeri A, Magazù S, Laganà G, Navarra M, Barreca D. Molecular basis of interactions between the antibiotic nitrofurantoin and human serum albumin: A mechanism for the rapid drug blood transportation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).
106. [www.macylab.com/uploads/2017/cp/UV-1900.pdf](http://www.macylab.com/uploads/2017/cp/UV-1900.pdf).
107. Lu D, Zhao X, Zhao Y, Zhang B, Zhang B, Geng M, et al. Binding of Sudan II and Sudan IV to bovine serum albumin: Comparison studies. *Food and Chemical Toxicology.* 2011;49(12).
108. Chamani JK, Vahedian-Movahed H, Saberi MR. Lomefloxacin promotes the interaction between human serum albumin and transferrin: A mechanistic insight into the emergence of antibiotic's side effects. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(1).
109. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 2006.
110. Charbonneau DM, Tajmir-Riahi HA. Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin. *Journal of Physical Chemistry B.* 2010;114(2).
111. Markarian SA, Aznauryan MG. Study on the interaction between isoniazid and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy: The effect of dimethylsulfoxide. *Mol Biol Rep.* 2012;39:7559–67.
112. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 1999;12(6).

113. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol.* 1996;6(3).
114. Dar AM, Mir S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech.* 2017;08(02).
115. Antunes DA, Devaurs D, Kaviraki LE. Understanding the challenges of protein flexibility in drug design. Vol. 10, *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2015.
116. Wang C, Wu QH, Li CR, Wang Z, Ma JJ, Zang XH, et al. Interaction of tetrandrine with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Analytical Sciences.* 2007;23(4).
117. Honcharova OO, Dmytrenko OP, Lesiuk AI, Kulish MP, Pavlenko OL, Naumenko AP, et al. Binding parameters and conjugation mechanisms in the solutions of BSA with antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 2023;750(1).
118. O.O. Honcharova OPDMPKKNMZAPNOLPDRO. Spectral properties of cerium dioxide nanoparticles. In: *Proceedings of X International Conference “Medical Physics – the Current Status, Problems, the Way of Development Innovation Technologies.”* 2021. p. 84–7.
119. O.O. Goncharova MPKOPDAILOLPIPTMPRAPNNMZMIKanyuk. Modeling of complexes of serum albumin with CeO<sub>2</sub> nanoparticles. In: *Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021).* 2021. p. 314.
120. 23. PDB ID: 4F5S. Bujacz A, BG. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68. 2012. p. 1278–89 Crystal Structure of Bovine Serum Albumin.
121. Loschen C, Migani A, Bromley ST, Illas F, Neyman KM. Density functional studies of model cerium oxide nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 2008;10(37).
122. Park J, KMS, SDH. *Crystal Structure of plasma-derived Human Serum Albumin.* 2018.

123. Khoshgozaran Roudbaneh SZ, Kahbasi S, Sohrabi MJ, Hasan A, Salihi A, Mirzaie A, et al. Albumin binding, antioxidant and antibacterial effects of cerium oxide nanoparticles. *J Mol Liq.* 2019;296.
124. Goncharenko NA, Dmytrenko OP, Kulish MP, Pavlenko OL, Lesiuk AI, Busko TO, et al. Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with anticancer drug gemcitabine. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 2020;701(1).
125. Goncharenko NA, Dmytrenko OP, Pavlenko L, Kulish MP, Pundyk IP, Lesyuk I, et al. Complexation peculiarities in “Doxorubicin–Bovine serum albumin–gold nanoparticles” heterosystem. The fluorescence study. *Ukrainian Journal of Physics.* 2020;65(6).
126. Holovko OO, Dmytrenko OP, Lesiuk AI, Kulish MP, Pavlenko OL, Naumenko AP, et al. Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 2023;
127. Pan J, Ye Z, Cai X, Wang L, Cao Z. Biophysical Study on the Interaction of Ceftriaxone Sodium with Bovine Serum Albumin Using Spectroscopic Methods. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012 Dec;26(12):487–92.
128. PubChem [Internet]. 2D structure image of CID 5280343 (Quercetin). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=2D-Structure&fullscreen=true>
129. Holovko O, Dmytrenko O, Kulish M, Lesiuk A, Pavlenko O, Naumenko A, et al. Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin. *J Mol Liq.* 2024 Dec 1;415.
130. Holovko O, Dmytrenko O, Kulish M, Lesyuk A, Kanyuk M, Naumenko A, et al. Complexation of HSA with the Medicine Quercetin. In: *Springer Proceedings in Physics.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. p. 131–49.

131. Holovko O, Dmytrenko O, Kulish M, Lesiuk A, Kaniuk M, Naumenko A, et al. Human serum albumin and curcumin heteroassociate in aqueous solutions. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2024;768(14):638–52.
132. Paczkowska M, Lewandowska K, Bednarski W, Mizera M, Podborska A, Krause A, et al. Application of spectroscopic methods for identification (FT-IR, Raman spectroscopy) and determination (UV, EPR) of quercetin-3-O-rutinoside. Experimental and DFT based approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;140.
133. O. Holovko ODMKOPIDALANMK. The complex formation of HSA with the medicine quercetin. In: *Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023)*. 2023. p. 398.
134. Dai J, Zou T, Wang L, Zhang Y, Liu Y. Investigation of the interaction between quercetin and human serum albumin by multiple spectra, electrochemical impedance spectra and molecular modeling. *Luminescence*. 2014;29(8).
135. Kar T, Basak P, Sen S, Ghosh RK, Bhattacharyya M. Analysis of curcumin interaction with human serum albumin using spectroscopic studies with molecular simulation. *Front Biol (Beijing)*. 2017;12(3).
136. Xie MX, Xu XY, Wang YD. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2005;1724(1–2).
137. Alsaif NA, Wani TA, Bakheit AH, Zargar S. Multi-spectroscopic investigation, molecular docking and molecular dynamic simulation of competitive interactions between flavonoids (quercetin and rutin) and sorafenib for binding to human serum albumin. *Int J Biol Macromol*. 2020;165.
138. O. Holovko ODMKOPIDALANMK. The human serum albumin and the medicine curcumin heteroassociation in aqueous solutions. In: *Book of*

- abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023). 2023. p. 401.
139. Tian J, Liu J, Xie J, Yao X, Hu Z, Chen X. Binding of wogonin to human serum albumin: A common binding site of wogonin in subdomain IIA. *J Photochem Photobiol B*. 2004;74(1).
  140. Zhao X, Liu R, Chi Z, Teng Y, Qin P. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(16).
  141. Dmytrenko O, Kulish M, Pavlenko O, Lesiuk A, Momot A, Busko T, et al. Mechanisms of Heteroassociation of Ceftriaxone and Doxorubicin Drugs with Bovine Serum Albumin. In: *Springer Proceedings in Physics*. 2022.
  142. Gorbyk PP, Petranovska AL, Dmytrenko OP, Pavlenko OL, Pundyk IP, Busko TO, et al. Adsorption Mechanisms of Gemcitabine Molecules on the Surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with Biocompatible Coatings. In: *Springer Proceedings in Physics*. 2020.
  143. Goncharenko NA, Pavlenko OL, Dmytrenko OP, Kulish MP, Lopatynskiy AM, Goncharova OO, et al. Understanding prodrugs: complexation in aqueous solutions of doxorubicin, bovine serum albumin and gold nanoparticles. *Applied Nanoscience (Switzerland)*. 2020;10(8).
  144. Tian FF, Jiang FL, Han X Le, Xiang C, Ge YS, Li JH, et al. Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010;114(46).
  145. O. Holovko ODMKOPIDALANMKTV. Mechanisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin. In: *Book of abstracts international research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2023)*. 2023. p. 397.
  146. Sadeghi-kaji S, Shareghi B, Saboury AA, Farhadian S. Investigation on the structure and function of porcine pancreatic elastase (PPE) under the

- influence of putrescine: A spectroscopy and molecular simulation study. *J Mol Liq.* 2019;289.
147. Vahedi SZ, Farhadian S, Shareghi B, Asgharzadeh S, Evini M. Multi spectroscopy and molecular modeling aspects related to drug interaction of aspirin with alpha chymotrypsin; structural change and protease activity. *J Mol Liq.* 2022;352.
  148. Farhadian S, Heidari-Soureshjani E, Hashemi-Shahraki F, Hasanpour-Dehkordi A, Uversky VN, Shirani M, et al. Identification of SARS-CoV-2 surface therapeutic targets and drugs using molecular modeling methods for inhibition of the virus entry. *J Mol Struct.* 2022;1256.
  149. Eslami-Farsani R, Farhadian S, Shareghi B, Momeni L. Molecular interaction of ethylene glycol to hurt Myoglobin: Insights from spectroscopic and molecular modeling studies. *J Mol Liq.* 2023;376.
  150. Zohreh Vahedi S, Farhadian S, Shareghi B, Asgharzadeh S. Interaction between the antioxidant compound safranal and  $\alpha$ -chymotrypsin in spectroscopic fields and molecular modeling approaches. *J Biomol Struct Dyn.* 2024;42(8).
  151. Eslami-Farsani R, Farhadian S, Shareghi B. Exploring the structural basis of conformational alterations of myoglobin in the presence of spermine through computational modeling, molecular dynamics simulations, and spectroscopy methods. *J Biomol Struct Dyn.* 2022;40(8).
  152. Mohammadi M, Shareghi B, Farhadian S, Momeni L, Saboury AA. The interaction of xylitol with carboxypeptidase A: The influence of xylitol on enzyme structure and activity. *J Mol Struct.* 2022;1250.