

## **СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ БЕЛКОВ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

П.О. ВАРДЕВАНЯН, М.А. ШАГИНЯН,  
Н.Х. ПЕТРОСЯН, Е.Ш. МАМАСАХЛИСОВ\*

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

\*e-mail: y.mamasakhlisov@ysu.am

(Поступила в редакцию 12 октября 2020 г.)

Методом флуоресцентной спектроскопии исследовано взаимодействие низкомолекулярных соединений с белками на примере связывания метиленового синего (МС), метилового фиолетового (МФ) и Hoechst 33258 (Н33258) с сывороточным альбумином человека (САЧ). На основании анализа спектров флуоресценции показано, что САЧ связывается с указанными лигандами и образует комплексы, при этом происходит тушение флуоресценции лиганда, что, в свою очередь, является статическим типом тушения. Рассчитаны энтальпия, энтропия и свободная энергия Гиббса комплексообразования и показано, что основными взаимодействиями, стабилизирующими такого рода комплексы являются водородные связи и ван дер Ваальсовым взаимодействия между лигандами и САЧ. С другой стороны, показано, что этот процесс является термодинамически выгодным. Н33258 связывается с САЧ сильнее, чем с остальными двумя лигандами, о чем свидетельствуют спектры флуоресценции. Показано, что в случае связывания МС с САЧ, при относительно высоких концентрациях САЧ, тушение происходит двумя способами – статическим и динамическим.

### **1. Введение**

Известно, что белки являются первичными мишенями для многих низко- и высоко-молекулярных соединений, входящих в клетки человеческого организма. Среди большого количества связывающихся соединений, лекарственные препараты представляют особый интерес, поскольку они доходят до конечной клетки, будучи транспортированными белками, в том числе сывороточными альбуминами. Кроме того, связывание лекарственных препаратов с белками значительно влияет на их свойства, начиная из адсорбции до метаболических и экскреционных свойств [1]. Поэтому исследования по особенностям взаимодействий различных низкомолекулярных соединений – потенциальных лекарственных препаратов с САЧ вызывают огромный научный интерес. Известно, что сывороточные альбумины являются широко распространенными белками в системе кровообращения, основной функцией которых является транспорт жирных

кислот, а также многих эндогенных и экзогенных соединений [2–4]. Кроме того, сывороточные альбумины играют важную роль в доставке и эффективности лекарственного препарата [5]. В литературе существует множество работ, посвященных данной проблеме [2,6–18]. Изучение механизмов связывания различных лекарственных препаратов с сывороточными альбуминами имеет важное значение во многих аспектах клинической медицины, биотехнологии, фармакологии и т.д. [13,14].

Среди альбуминов, сывороточный альбумин человека (САЧ) является одним из хорошо изученных белков: так, кристаллографическим методом показано, что САЧ является полипептидной цепью, которая содержит 585 аминокислот и 3 гомологических  $\alpha$ -спиральных доменов (I-III) и один триптофановый остаток (Trp-214) [15].

Метиленовый синий (МС), также известный как тетраметилтиониновый хлорид или швейцарский синий, является копланарным полициклическим ароматическим основным красителем, который принадлежит к тиазиновому классу (Рис.1а). Он используется для анализа внутриклеточного редокс метаболизма, а также как эффективный антидот, биологический краситель и диагностический агент для многих заболеваний, таких как карцинома и т.д. [2].

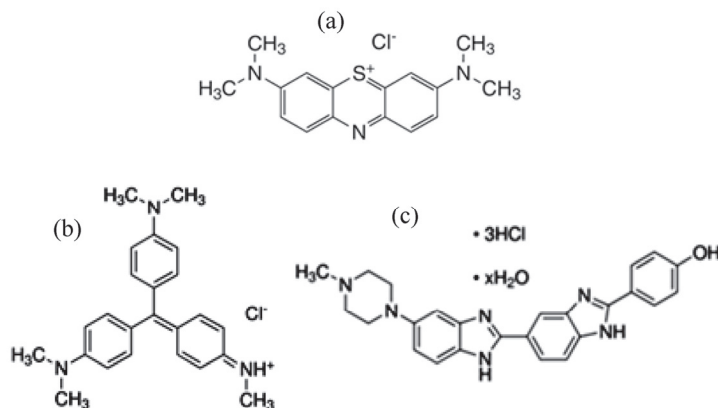


Рис.1. Молекулярная структура (а) метиленового синего, (b) метилового фиалетового и (c) Hoeschst 33258.

Метиловый фиолетовый (МФ), известный также как кристалльный фиолетовый, является трифенилметановым промышленным красителем и широко используется в различных целях: как биологический краситель, фунгицид в сельском хозяйстве, лекарственный препарат для кожных заболеваний с наружным применением (рис.1b). Кристалльный фиолетовый является катионным красителем, используемым для детекции ионов металла. Он также применяется как детектор нуклеиновых кислот, основанный на взаимодействии с ДНК, он также известен своей хорошей стерилизацией, малой токсичностью и гормезисом.

Учитывая большое количество важных особенностей кристалльного фиолетового, представляет интерес изучение взаимодействия МФ с известными переносчиками в организме – сывороточными альбуминами.

Hoechst 33258 (H33258) известен как ДНК-специфический лиганд, который обладает высоким сродством к ДНК, умеренной цитотоксичностью и хорошей проницаемостью в клеточные мембраны (рис. 1с). Благодаря этим свойствам, H33258 является перспективным материалом для дизайна новых лекарственных препаратов на его основе, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, которые могут взаимодействовать и с белками.

Целью данной работы является исследование особенностей связывания МС, МФ и H33258 с САЧ и сравнение полученных результатов.

## 2. Материалы и методы

В экспериментах использованы 1%-ный раствор сывороточного альбумина человека (“Sigma”, USA), метиленовый синий, метиловый фиолетовый, Hoechst 33258 (“Sigma”, USA), физиологический раствор. Концентрации МС, МФ и H33258 определены спектрофотометрически, с использованием следующих значений коэффициентов экстинкции –  $\epsilon_{664} = 76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{590} = 87000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и  $\epsilon_{343} = 42000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  соответственно. Усреднение данных проведено из 5-и значений.

Спектры флуоресценции комплексов САЧ с отмеченными лигандами получены с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Австралия). Возбуждение образцов проведено при длинах волны 620, 590 и 343 нм соответственно. Спектры флуоресценции регистрировались в интервалах  $640 \leq \lambda \leq 750$  нм для комплексов МС с САЧ,  $690 \leq \lambda \leq 710$  нм для комплексов МФ с САЧ и  $400 \leq \lambda \leq 600$  нм для комплексов H33258 с САЧ. Эти интервалы выбраны во избежание одновременного поглощения лиганда и САЧ. После получения спектра флуоресценции чистого лиганда, проводилась титрация раствора лиганда растворами САЧ при концентрационных соотношениях лиганд/САЧ от 1/2 до 1/10. Ошибка измерения составляла 5–10%.

## 3. Результаты и обсуждение

Спектры флуоресценции МС, МФ и H33258 и их комплексов с САЧ представлены на рис. 2а,б,с соответственно. Из рис. 2 видно, что во всех случаях максимумы спектров флуоресценции лиганда уменьшается в ходе титрования раствором САЧ. Это свидетельствует о том, что локальное окружение этих лигандов изменяется при связывании с САЧ. По сравнению с двумя спектрами наверху, в случае H33258 уменьшение более выражено, что говорит о том, что, по всей вероятности, H33258 связывается с САЧ сильнее, чем остальные два лиганда.

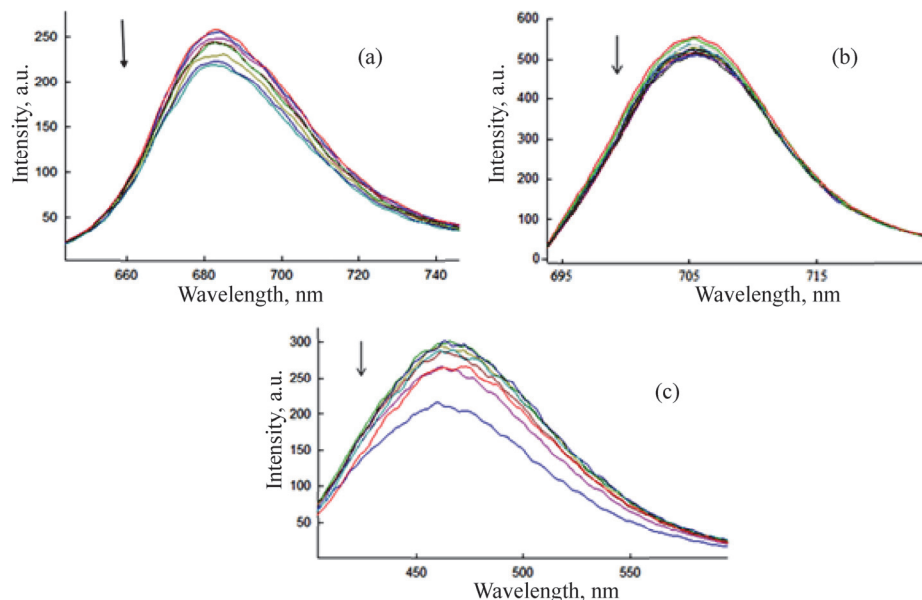


Рис.2. Спектры флуоресценции МС и комплексов (а) МС-альбумин, (б) МФ и комплексов МФ-альбумин, Н33258 и (с) комплексов Н33258-альбумин.

Взаимодействие различных низкомолекулярных соединений – лигандов с САЧ может быть исследовано разными методами, показывающими, что эти лиганды, будучи тушителями флуоресценции, либо сталкиваются с молекулами САЧ, либо образуют комплекс с ним [2,6,7,9,13]. Известно, что как минимум МС и МФ являются статическими тушителями, образуя комплекс с САЧ. С другой стороны, интенсивность флуоресценции лигандов уменьшается при взаимодействии с САЧ, что также может свидетельствовать об эффекте тушения САЧ. Спектры флуоресценции и их тушение анализируются с использованием уравнения Штерна–Фольмера:

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

где  $F_0$  и  $F$  являются интенсивностями флуоресценции МС, МФ и Н33258 в отсутствие и присутствии САЧ соответственно.  $K_{SV}$  является константой тушения Штерна–Фольмера и  $C$  – концентрацией тушителя (в данном случае САЧ).

Кривые Штерна-Фольмера связывания МС, МФ и Н33258 с САЧ при температурах 25°C, 35°C и 45°C показаны на рис.3. Из рис.3а видно, что при температурах 35°C и 45°C кривые Штерна-Фольмера комплексов МС-САЧ имеют кривизну по направлению вверх – начиная с определенных концентраций. Если бы имело место только статическое тушение, то кривая должна была быть линейной [6]. В данном случае имеет место комбинированное тушение (динамическое и статическое), что приводит к образованию наклонности вверх на указанной

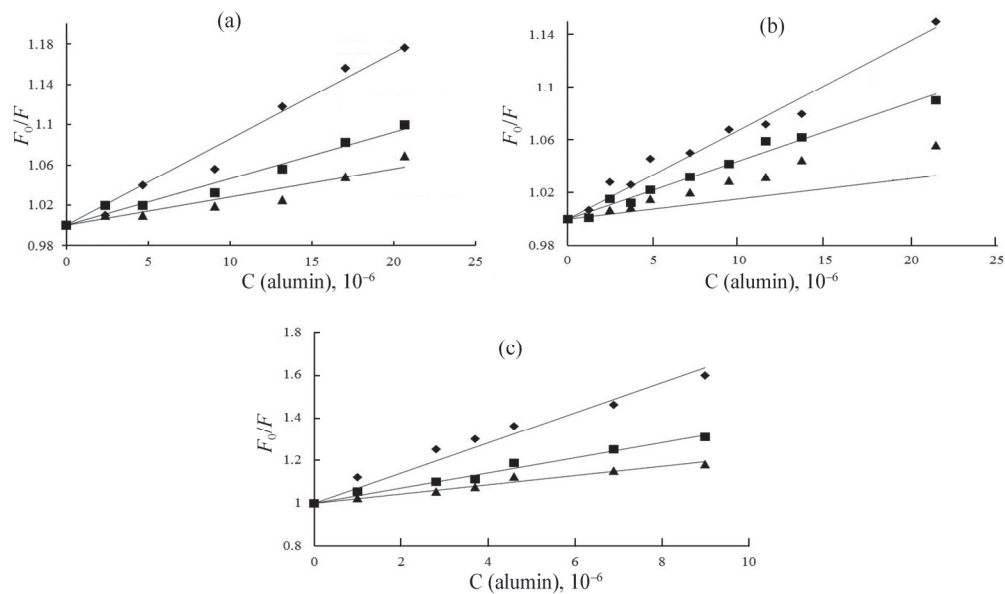


Рис.3. Кривые Штерна-Фольмера комплексов (а) МС-альбумин, (б) МФ-альбумин и (с) Н33258-альбумин. Кривая 1 для всех случаев соответствует температуре 25°C, кривая 2 – 35°C, кривая 3 – 45°C.

кривой. Для других двух лигандов такой эффект не обнаружен, поэтому можно считать, что тушение только статическое.

Значения констант тушения Штерна-Фольмера рассчитаны из кривых, представленных на рис. 3 и приведены в таблице 1. Из данных, приведенных в таблице 1 видно, что значения констант Штерна-Фольмера уменьшаются с увеличением температуры. Это свидетельствует о том, что в данном случае происходит статическое тушение, тогда как при динамическом тушении эти значения должны были расти с увеличением температуры. Видно также, что самое сильное тушение лиганда происходит в случае взаимодействия Н33258 с САЧ. Уменьшение значений  $K_{SV}$  при высоких значениях температуры обусловлено тем, что вероятность взаимодействия белка и лиганда уменьшается из-за увеличения

Табл.1. Исходный и фазовый состав образцов, параметры элементарной ячейки гексаалюминатов

| Температура, °C | Значения $K_{SV}$ , л/моль |                   |                    |
|-----------------|----------------------------|-------------------|--------------------|
|                 | МС-САЧ                     | МФ-САЧ            | Н33258-САЧ         |
| 25              | $8.6 \times 10^3$          | $6.8 \times 10^3$ | $7.04 \times 10^4$ |
| 35              | $4.6 \times 10^3$          | $4.4 \times 10^3$ | $3.5 \times 10^4$  |
| 45              | $2.8 \times 10^3$          | $1.5 \times 10^3$ | $2.15 \times 10^4$ |

тепловой энергии.

На основании полученных данных, приведенных в таблице 1, построены кривые зависимости  $\ln K_{SV}$  от  $1/T$  (кривые не приведены) по следующему уравнению:

$$\ln K_{SV} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}. \quad (2)$$

Из уравнения (2) получены значения  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$ , а значение  $\Delta G^0$  рассчитано из следующих уравнений:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0, \quad (3)$$

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_{SV}. \quad (4)$$

Значения указанных термодинамических параметров ( $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$ ,  $\Delta G^0$ ) представлены в таблице 2.

Как видно из результатов, представленных в таблице 2, для всех типов комплексов, значения всех трех термодинамических параметров уменьшаются. Согласно суммированию Росса и Субрамания, относительно оценке типа сил связывания между органическими микромолекулами и биологическими макромолекулами, гидрофобная сила взаимодействия увеличивает  $\Delta H$  и  $\Delta S$  системы, в то время как водородные связи и ван дер Ваальсовы взаимодействия уменьшают эти значения. Сила электростатического взаимодействия приводит к значениям  $\Delta H^0 \approx 0$  и  $\Delta S^0 > 0$ . С другой стороны, отрицательное значение  $\Delta G^0$  свидетельствует о спонтанности процесса взаимодействия. Основываясь на вышеотмеченных предположениях и исходя из данных, полученных в работе, мы предполагаем, что во время взаимодействия МС, МФ и Н33258 с САЧ, водородные связи и ван дер Ваальсовы взаимодействия играют важнейшую роль в процессе связывания, которая является спонтанной. Учитывая, что абсолютное значение  $\Delta H$  больше, чем абсолютное значение  $\Delta S$ , благодаря чему значение  $\Delta G$  также имеет отрицательный знак, образование комплекса лиганд-САЧ термодинамически выгодно, несмотря на то, что с энтропийной точки зрения оно не желательно.

Стоит также отметить, что Н33258 проявляет самое высокое сродство к

Табл.2. Значения термодинамических параметров связывания МС, МФ и Н33258 с САЧ

|            | $\Delta H^0$ , кДж/моль | $\Delta S^0$ , Дж/моль·К | $\Delta G^0$ , кДж/моль |
|------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| МС-САЧ     | -44.4                   | -73.4                    | -22.5                   |
| МФ-САЧ     | -59.5                   | -125                     | -22.2                   |
| Н33258-САЧ | -46.8                   | -64.3                    | -27.6                   |

САЧ. Литературные данные свидетельствуют о том, что Н33258 также связывается с ДНК-топоизомеразой 1. На основе этих данных можно заключить, что Н33258, будучи АТ-специфическим лигандом для ДНК, связываясь с САЧ, может связываться также с ДНК по тому же способу как с топоизомеразой. Это может иметь важное значение для влияния на функциональные особенности ДНК посредством комплексов Н33258-САЧ, модулируя клеточную активность.

#### 4. Выводы

На основе полученных результатов можно заключить, что САЧ связывается с МС, МФ и Н33258 и образует комплексы, что выявляется из статического тушения интенсивностей флуоресценции МС, МФ и Н33258 со стороны САЧ. Комплексообразование происходит благодаря водородным связям и ван дер Ваальсовым взаимодействиям между лигандами и САЧ. Этот факт основывается на расчете термодинамических параметров – энтропии и энтальпии. С другой стороны, этот процесс является спонтанным, о чем свидетельствует отрицательное значение свободной энергии Гиббса. Константы тушения Штерна-Фольмера имеют самые высокие значения для комплексов Н33258-САЧ, самые низкие – для комплексов МФ-САЧ. С увеличением температуры наблюдается уменьшение значений  $K_{SV}$ , что означает, что тепловая энергия приводит к увеличению подвижности молекул в растворе, что в свою очередь, уменьшает вероятность комплексообразования. Следует также отметить, что в случае связывания МС с САЧ, при относительно высоких концентрациях САЧ, тушение происходит двумя – статическим и динамическим способами, доказательством чего служит наклонность вверх на кривой Штерна-Фольмера.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Q. Wu, S. Li, X. Fu, T. Yang, H. Chen, Y. Guan, B. Xie, Z. Sun. J. Appl. Spectroscopy, **80**, 884 (2014).
2. Y. Hu, W. Li, Y. Liu, J.-X. Dong, S.-S. Qu. J. Pharm. Biomed. Anal., **39**, 740 (2005).
3. S. Curry, H. Mandelkov, P. Brick, N. Franks. Nat. Struct. Biol., **5**, 827 (1998).
4. X. Zhu, Y. Hu, A. Gong. Anal. Chim. Acta, **592**, 24 (2007).
5. R.E. Olson, D.D. Christ. Ann. Rep. Med. Chem., **31**, 327 (1996).
6. Y. Hu, S. Xu, X. Zhu, A. Gong. Spectrochim. Acta A, **74**, 526 (2009).
7. M. Qin, T. Yin, W. Shen. J. Dispers. Sci. Technol., **37**, 1623 (2016).
8. W. Sun, J.-Y. Han, Q.-J. Li, K. Jiao. S. Afr. J. Chem., **60**, 42 (2007).
9. Y.-J. Hu, Y. Liu, R.-M. Zhao, J.-X. Dong, S.-S. Qu. J. Photochem. Photobiol. A, **179**, 324 (2006).
10. N. Akbay, T.T. Tok, Z. Seferoglu, E. Gokoglu. J. Biomol. Struct. & Dyn., **36**, 3114 (2018).
11. X. Liu, X. Wu, J. Yang. Talanta, **81**, 760 (2010).

12. **Y. Li, Y. Zhang, S. Sun, A. Zhang, Y. Liu.** J. Photochem. Photobiol. B, **128**, 12 (2013).
13. **G.G. Ariga, P.N. Naik, S.T. Nandibewoor, S.A. Chimatadar.** J. Biomol Struct & Dyn., **35**, 3161 (2017).
14. **H. Zhou, X. Shi, Y. Fan, Z. He, W. Gu, L. Ye.** J. Biomol. Struct. & Dyn., **36**, 254 (2018).
15. **J. Liu, Y. Yue, J. Wang, X. Yan, R. Liu, Y. Sun, X. Li.** Spectrochim. Acta A, **145**, 473 (2015).
16. **P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.V. Minasyants.** J. Contemp. Phys., **50**, 381 (2015).
17. **Y.Sh. Mamasakhlisov, A.P. Antonyan, A.Y. Mamasakhlisov, Sh.A. Tonoyan, P.H. Vardevanyan.** J. Contemp. Phys., **52**, 173 (2017).
18. **P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan.** J. Contemp. Phys., **55**, 94 (2020).

#### SPECTROSCOPIC STUDY OF PROTEIN COMPLEXES WITH LOW-MOLECULAR COMPOUNDS

P.O. VAREDEVANYAN, M.A. SHAHINYAN,  
N.H. PETROSYAN, Y.Sh. MAMASAKHLISOV

The binding peculiarities of methylene blue (MB), methyl violet (MV) and Hoechst 33258 (H33258) with human serum albumin (HSA) have been studied, using the fluorescence spectroscopy method. Based on the fluorescence spectra analysis it was shown that HSA binds to the all mentioned ligands and forms complexes, meanwhile a quenching of the ligand fluorescence occurs, which was found out to be a static quenching type. The thermodynamic parameters (entropy, enthalpy and Gibbs free energy) were calculated and it was revealed that the complex-formation takes place due to hydrogen bonds and van der Waals interactions between ligands and HSA. On the other hand, this process was revealed to be thermodynamically allowed. H33258 binds to HSA stronger as compared to the other two ligands, which becomes obvious from the fluorescence spectra. It was also shown that in the case of MB binding to HSA, at relatively high concentrations of HSA, the quenching occurs via both static and dynamic modes.