

КИНЕТИЧЕСКИЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ С АЛЬБУМИНОМ

ПШЕНКИНА Н. Н.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,
Санкт-Петербург

Пшенкина Н. Н. Кинетический и термодинамический анализ взаимодействия лигандов с альбумином // Мед. академ. журн. 2010. Т. 10. № 3. С. 130–138. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Представления о механизмах взаимодействия лекарственных веществ с сывороточным альбумином имеют большое значение для понимания фармакокинетических и фармакодинамических процессов. В работе исследованы взаимодействия атенолола, ибупрофена, фенилбутазона и варфарина с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Эксперименты проводились *in vitro*, исследования взаимодействия лигандов с альбумином выполнялось с помощью флуоресцентного анализа, основанного на эффекте концентрационного тушения флуоресценции белка при связывании с лигандами. Установлено, что тушение флуоресценции BSA ибупрофеном, фенилбутазоном и варфарином носило статический характер и было связано с образованием лиганд-протеинового комплекса, тогда как в случае атенолола имело место динамическое тушение флуоресценции BSA. Были рассчитаны константы взаимодействия лигандов с альбумином, которые при 25 °C составили: $3,3 \times 10^2$; $3,6 \times 10^6$; $1,4 \times 10^5$ и $7,9 \times 10^5$ M⁻¹ для атенолола, ибупрофена, фенилбутазона и варфарина соответственно. Анализ тушения лигандами BSA, выполненный при разных температурах, позволил вычислить термодинамические параметры связывания ΔG , ΔH и ΔS . Анализ полученных результатов в соответствии с принципами термодинамики показал, что в связывании ибупрофена и варфарина с BSA ведущую роль играет изменение энтальпии, тогда как связывание фенилбутазона – это процесс, зависимый от изменений энтропии. Взаимодействие атенолола с BSA сопровождалось эквивалентными изменениями энтальпии и энтропии. Обсуждается значение термодинамических и кинетических изменений для интерпретации механизмов лиганд-альбуминового связывания.

Ключевые слова: альбумин, лиганд, связывание, тушение флуоресценции, термодинамика.

Pshenkina N. N. Kinetic and thermodynamic analysis of ligand interactions with albumin // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 3. P. 130–138. Institute for Experimental Medicine of the Nord-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376.

Drug interactions with serum albumin are of great use for the understanding of pharmacokinetic and pharmacodynamic mechanisms. In the paper interactions of atenolol, ibuprofen, phenylbutazone and warfarin with bovine serum albumin (BSA) were investigated *in vitro* by fluorescence quenching method. It was proved that the fluorescence quenching of BSA by ibuprofen, phenylbutazone and warfarin was mainly the result of static quenching due to complex formation, while in the case of atenolol BSA fluorescence was quenched dynamically. Binding constant *K* volumes at 25 °C were 3.3×10^2 , 3.6×10^6 , 1.4×10^5 , and 7.9×10^5 M⁻¹ for atenolol, ibuprofen, phenylbutazone and warfarin, respectively. Quenching analysis at different temperatures allowed calculating thermodynamic parameters such as ΔG , ΔH and ΔS . The results analysis according for thermodynamic principles achieved that the binding of ibuprofen and warfarin with BSA is enthalpy driven, whereas phenylbutazone binding is entropy driven. Interaction of atenolol with BSA was accompanied by equivalent changes of enthalpy and entropy. The significance of thermodynamic and kinetic data for the interpretation of binding mechanisms is discussed.

Key words: albumin, ligand, binding, fluorescence quenching, thermodynamics.

Для корреспонденции: Пшенкина Надежда Николаевна, сл. адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12; тел. сл. (812) 542-35-07, моб. +7 (921) 331 36 52, факс: (812) 542-57-45, e-mail: pshenkina@mail.ru

Белки плазмы, и прежде всего сывороточный альбумин, помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняют важную функцию транспорта эндогенных и экзогенных субстанций. В связанном состоянии лекарственные вещества защищены от процессов метаболизма и элиминации [15, 20, 23]. В результате комплекс альбумин-лиганд формирует в крови депо, благодаря которому лекарство дольше циркулирует в кровотоке и может более эффективно доставляться к

органам-мишеням, не подвергаясь неспецифическому рассеянию. Степень и интенсивность связывания оказывают существенное влияние на фармакокинетические, фармакодинамические и токсические свойства лекарственных веществ, длительность действия, концентрацию активного препарата в биологических жидкостях и на рецепторном участке, а в конечном счете – на характер фармакологического действия и терапевтический эффект [6, 19, 25]. В связи с этим изучение механизмов связывания лекарственных

препаратов с сывороточным альбумином имеет фундаментальное значение для фармакокинетики и фармакодинамики.

На долю сывороточного альбумина приходится около 60% всех плазматических белков, и для многих лигандов он является основным связывающим протеином плазмы. В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию малых молекул, в том числе лекарственных веществ [1, 3, 4, 12, 13, 21, 30]. В отличие от взаимодействия с активными центрами специфических рецепторов, связывание лигандов с альбумином носит неспецифический характер и происходит за счет различных типов взаимодействий: гидрофобных, дипольных, электростатических, посредством Ван-дер-Ваальсовых сил, водородных связей и др. Образующиеся при этом связи являются непрочными, легко диссоциирующими; величина энергии связи не превышает 8–10 ккал/моль. Эти взаимодействия входят в область «слабых связей», в то время как энергия «сильных связей» достигает нескольких десятков и даже превышает 100 ккал/моль [4].

Структура и функции альбумина в течение многих лет являются предметом многочисленных исследований [7, 10, 16, 27], благодаря которым молекулярная структура белка полностью расшифрована. Альбумин состоит из 585 аминокислотных остатков и имеет м.м. 66,5 кДа [16]. Кристаллографический анализ показал, что полипептидная цепь образует глобулу с размерами приблизительно $80 \times 80 \times 80 \times 30$ Å, около 67% цепи спирализовано в α -спираль [7, 17]. Альбумин состоит из трех похожих доменов (I–III), каждый из которых включает в себе по два субдомена (A и B). Несмотря на многообразие переносимых веществ, существует ограниченное число типов мест связывания на молекуле альбумина. G. Sudlow и соавт. выделили 2 сайта, которые до настоящего времени рассматриваются как основные центры связывания лигандов [26]. Сайт I расположен в субдомене IIА, а сайт II находится в субдомене IIIА. Маркерами сайта I являются варфарин, фенилбутазон, азапропазон; маркерами сайта II служат триптофан, диазепам, ибупрофен [9].

Несмотря на изученность альбумина, интерес к исследованию механизмов связывания лигандов с протеином не ослабевает, а напротив, развиваются все новые подходы к анализу данного взаимодействия. Широкое применение находят модельные эксперименты *in vitro* с использованием разнообразных возможностей спектроскопического анализа, в частности флуоресцентной спектроскопии [8, 24, 29, 31]. Дополнительные возможности в раскрытии механизмов лиганд-альбуминового связывания может предоставить комплексный подход, включающий спектроскопический и термодинамический анализ

взаимодействия. Попытка разработки такого подхода предпринята при выполнении настоящего исследования.

МЕТОДИКА

Анализ связывания лекарственных веществ с альбумином проводили в экспериментах *in vitro*. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (BSA, фирмы «Sigma», USA) лиофилизированный, фракция IV по Кону, свободный от жирных кислот. В качестве лигандов были проанализированы следующие лекарственные вещества: атенолол, варфарин, ибупрофен, фенилбутазон («Sigma», США).

Альбумин использовали в одной концентрации – 10 мкМ в растворе 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. Лекарственные вещества брали в постоянных концентрациях: 2,5–5–10–20–40–80 мкМ. Атенолол растворяли в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4. Варфарин, ибупрофен, фенилбутазон растворяли в небольшом количестве диметилсульфоксида (ДМСО) и доводили буфером до нужного объема. По данным литературы, ДМСО не оказывает собственного влияния на процесс связывания лигандов с альбумином [18].

К 2,5 мл раствора альбумина добавляли 0,05 мл раствора лиганда в диапазоне исследуемых концентраций. После инкубации в течение 1 ч при температуре 25 °С и 37 °С проводили измерение интенсивности флуоресценции альбумина на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» с использованием кварцевой кюветы шириной 1 см и термостатированной ячейки. Условия измерения: $\lambda_{\text{возб}} = 290$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 340$ нм, щели возбуждения и эмиссии – по 5 нм. Пробы анализировали в трех параллельных образцах и вычисляли среднее значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресцентный анализ. Бычий сывороточный альбумин (BSA) гомологичен сывороточному альбумину человека [16] и широко используется в экспериментах по изучению связывания с лигандами [11, 28, 31]. Внутренняя флуоресценция BSA, возбуждаемая при пропускании света длиной волны 285–295 нм обусловлена присутствием в молекуле белка двух триптофановых остатков: Trp-134 и Trp-212 [16]. Trp-212 локализован внутри гидрофобного кармана сайта I в субдомене IIА, тогда как Trp-134 находится на поверхности молекулы альбумина и более подвержен воздействию окружающих факторов.

Варфарин и фенилбутазон являются специфическими лигандами сайта I по Sudlow, а ибупрофен – лигандом сайта II [17]. По данным литературы, пе-

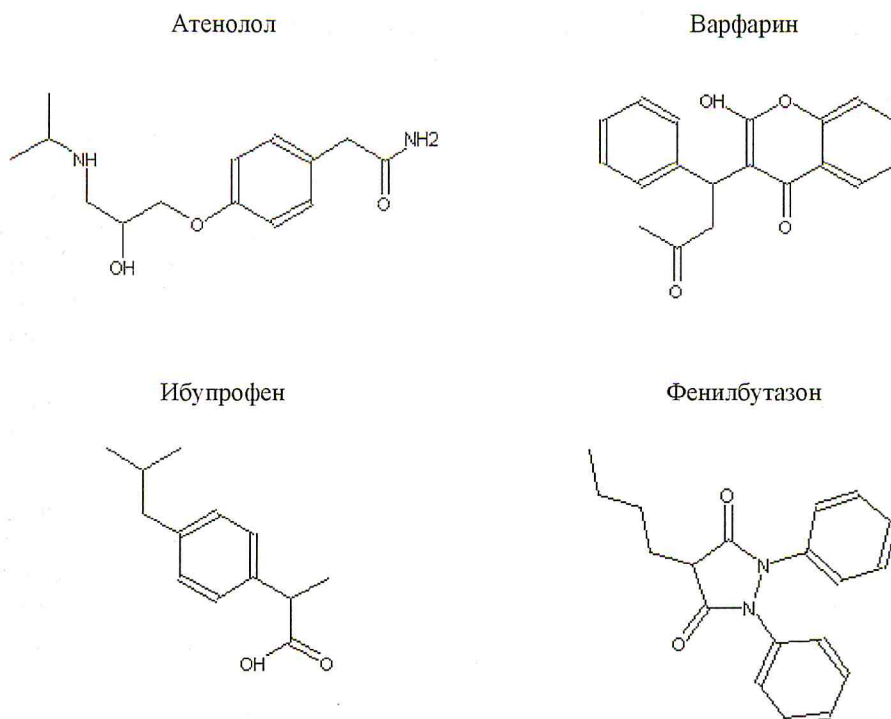


Рис. 1. Структура исследованных лекарственных веществ

речисленные вещества имеют высокую степень связывания с альбумином, в отличие от атенолола, который связывается с белком плазмы лишь на 6–16% [5]. Структурные формулы лекарственных веществ, использованных в работе, представлены на рис. 1.

При исследовании тушения флуоресценции альбумина в результате его взаимодействия с лекарственными веществами проводили сканирование спектра эмиссии в диапазоне длин волн от 300 до 380 нм при длине волны возбуждающего света 290 нм. Характерный спектр флуоресценции альбумина и эффект концентрационного тушения на примере связывания ибупрофена представлен на рис. 2. Верхняя кривая отображает спектр эмиссии альбумина без добавления тушителя. После добавления тушителя (ибупрофена) в возрастающих концентрациях флуоресценция белка снижается.

Общепринятым подходом к анализу результатов тушения флуоресценции является метод Штерна-Фольмера [2], который описывает закономерности взаимодействия флуорофора и тушителя следующим уравнением:

$$F_0/F = 1 + K_q[Q], \quad (1)$$

где F_0 – максимальная флуоресценцию альбумина в отсутствии лиганда, F – интенсивность флуоресценции белка в присутствии тушителя в концентрации $[Q]$, K_q – константа динамического тушения Штерна-Фольмера.

Данные по тушению флуоресценции альбумина атенололом, варфарином, ибупрофеном и фенилбутазоном представлены на рис. 3 в координатах F_0/F от $[Q]$. В случае прямолинейности графика прямая

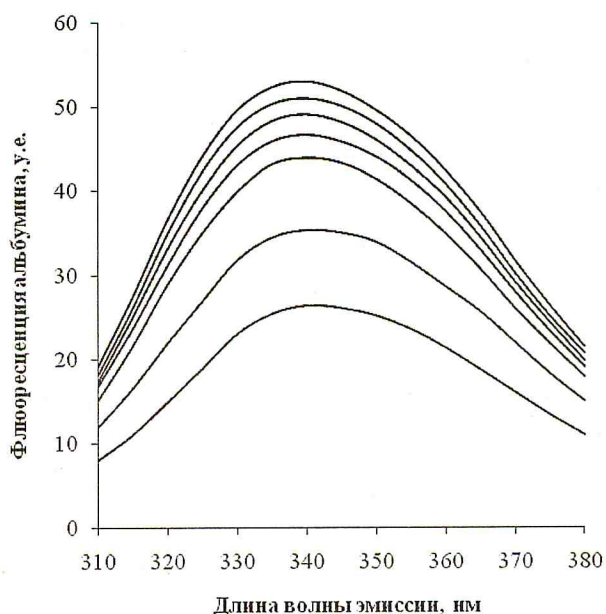


Рис. 2. Спектр эмиссии альбумина при тушении его флуоресценции ибупрофеном. Концентрация альбумина – 10 мкМ; длина волны возбуждающего света – 290 нм; концентрации ибупрофена (сверху вниз): 0–2,5–5–10–20–40–80 мкМ

имеет наклон, равный Kq . Однако на практике прямая зависимость встречается не часто.

Так, в проведенном исследовании график Штерна-Фольмера имел линейный вид лишь в случае атенолола. При связывании альбумина с варфарином, ибупрофеном и фенилбутазоном, как видно на рис. 3, график отклонялся в сторону оси ординат. Подобное отклонение графика свидетельствует о том, что тушение флуорофора происходит за счет как динамической, так и статической составляющей.

На рис. 3 приведены графики тушения флуоресценции альбумина, полученные при двух температурах: 25 °С и 37 °С. Анализ зависимости изменения флуоресценции от температуры, при которой происходит связывания белка с лигандом, позволяет сделать вывод о механизме тушения – статическом или динамическом. Динамическое (коллизонное) тушение – это тушение, возникающее при столкновении молекул. Статическое тушение происходит при образовании комплекса флуорофора и тушителя. Поскольку повышение температуры приводит к увеличению числа столкновений, бимолекуляр-

ная константа скорости динамического тушения с повышением температуры возрастает. Напротив, с ростом температуры увеличивается внутримолекулярная подвижность, стабильность образовавшихся комплексов снижается и, соответственно, значения констант статического тушения уменьшаются [2].

Кривые, описывающие взаимодействия с альбумином для варфарина, ибупрофена и фенилбутазона, при 25 °С лежат выше аналогичных кривых при 37 °С. Это говорит о статическом характере тушения, которое связано с образованием комплекса перечисленных лигандов и белка. На примере атенолола видно, что характер тушения флуоресценции альбумина в данном случае носит динамический характер, и не связан с образованием специфического комплекса. График имеет вид практически прямой линии с малым углом наклона, причем с повышением температуры активность тушения несколько возрастает, что также характерно для динамического тушения.

В контексте данного исследования представляют интерес прежде всего взаимодействия, связанные с образованием лиганд-протеинового комплекса. Для

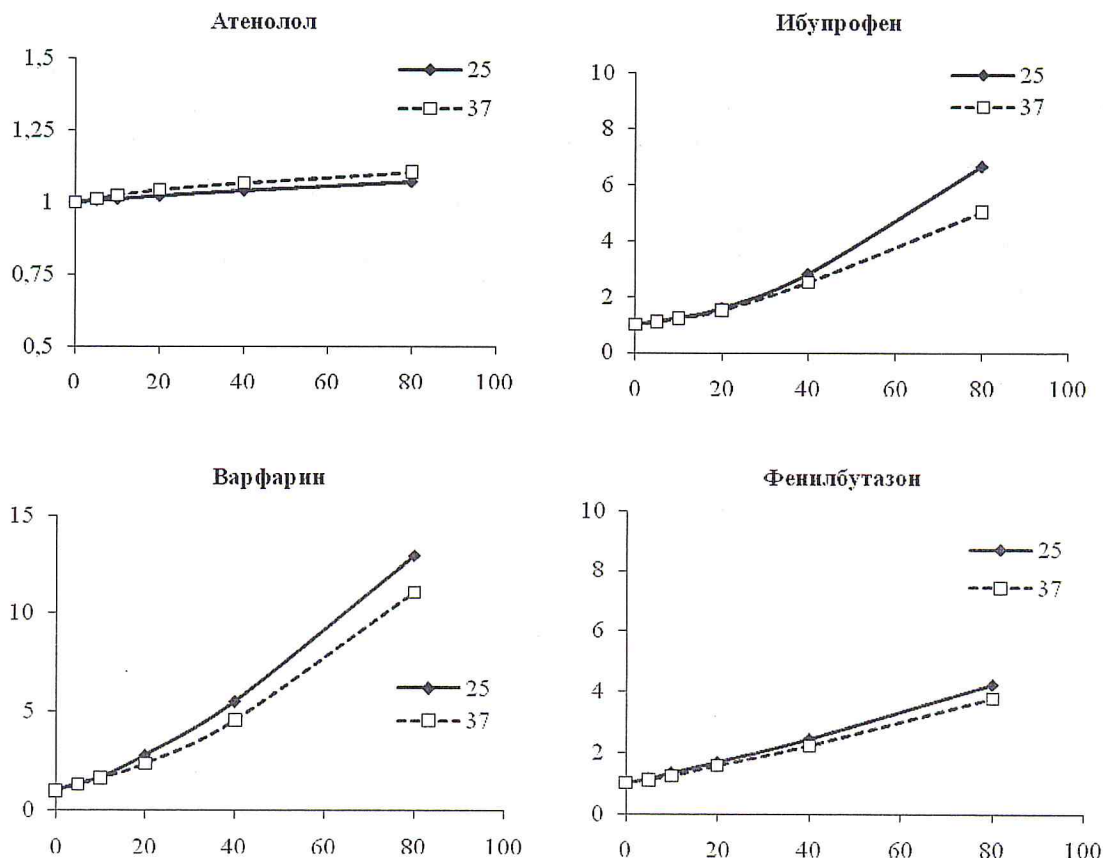


Рис. 3. График Штерна-Фольмера для концентрационного тушения флуоресценции альбумина атенололом, варфарином, ибупрофеном и фенилбутазоном.

По оси ординат – отношение полной флуоресценции альбумина к остаточной его флуоресценции после добавления лиганда, F_0/F . По оси абсцисс – концентрации лигандов $[Q]$, мкМ. Сплошная линия – результаты измерений при 25 °С; пунктирная линия – результаты измерений при 37 °С

анализа статического тушения обычно используется уравнение Штерна-Фольмера в логарифмическом виде [14, 28]:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K + n \cdot \log[Q], \quad (2)$$

где K – константа взаимодействия и n – число центров связывания.

График, построенный в координатах $\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right)$ от $\log[Q]$, дает пересечение с осью

ординат в точке $\log K$, а угол наклона численно равен количеству центров связывания лиганда n . Примеры логарифмических графиков для атенолола и варфарина приведены на рис. 4.

В соответствии с полученными графиками были рассчитаны значения констант взаимодействия и число центров связывания для исследованных препаратов. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, число центров связывания для исследованных препаратов было близким к 1. Это обусловлено тем, что взаимодействие

лигандов с альбумином протекало при сопоставимых концентрациях реагирующих веществ и имело специфический характер. Константы взаимодействия K варфарина, ибупрофена и фенилбутазона с альбумином были достаточно высокими – порядка 10^5 – 10^6 M^{-1} . Вместе с тем константа связывания K для атенолола была очень низкой.

Термодинамический анализ. Для понимания механизма взаимодействия лигандов с альбумином важна не только количественная оценка степени связывания, но и характеристика процессов, движущих образование лиганд-протеинового комплекса. В связи с этим в настоящем разделе работы был проведен анализ взаимодействия лекарственных веществ с альбумином с позиции законов термодинамики.

Функциями состояния в термодинамике являются изменения стандартной свободной энергии ΔG , энтальпии ΔH и энтропии ΔS . Как известно, энтальпия – это функция теплосодержания вещества, а энтропия – это функция состояния, являющаяся мерой неупорядоченности системы, т. е. возможности конфигурирования. Связь между этими параметрами описывается законом Гесса:

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

Таблица 1

Параметры взаимодействия лекарственных веществ с сывороточным альбумином в опытах *in vitro*

Лекарственные вещества	Константа взаимодействия K , M^{-1}		Число центров связывания, n	
	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С
Атенолол	$3,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	0,85	0,74
Варфарин	$7,9 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	1,27	1,26
Ибупрофен	$3,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	1,42	1,34
Фенилбутазон	$1,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	1,13	1,17

Примечание. K – константа взаимодействия лигандов с альбумином (M^{-1}); n – число центров связывания лиганда на молекуле альбумина.

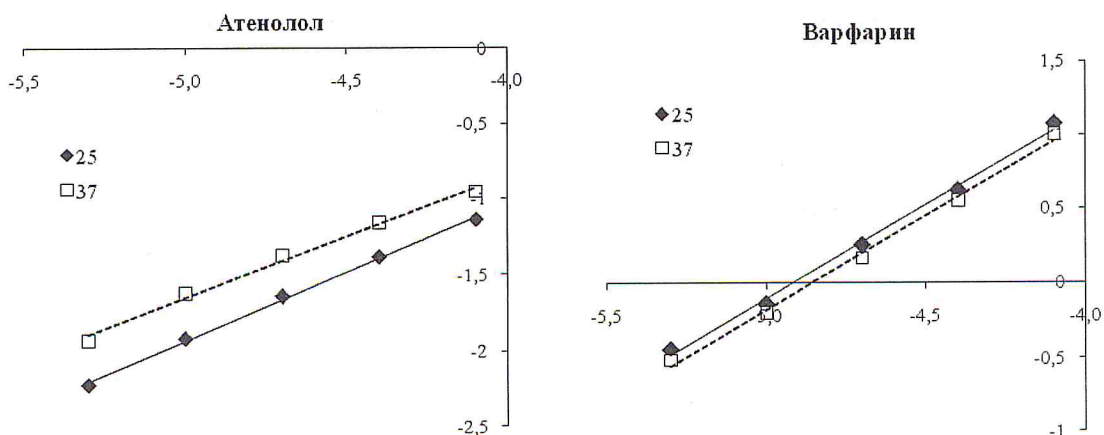


Рис. 4. Логарифмический график Штерна-Фольмера для тушения флуоресценции альбумина атенололом и варфарином. По оси ординат – логарифм отношения концентраций связанного и свободного альбумина после добавления лиганда, $\log(F_0 - F / F)$. По оси абсцисс – логарифм взаимодействующих концентраций лигандов, $\log[Q]$. Сплошная линия – результаты измерений при 25 °С; пунктирная линия – результаты измерений при 37 °С

Отрицательный сдвиг ΔG в результате реакции характеризует возможность самопроизвольного протекания процесса, в нашем случае – связывания лекарственного вещества с альбумином. Как следует из закона Гесса, самопроизвольно могут протекать процессы, сопровождающиеся снижением энтальпии или увеличением энтропии. При протекании процесса с уменьшением энтальпии происходит образование более упорядоченного энергетически выгодного состояния вещества. Напротив, протекание процесса с увеличением энтропии реализует стремление системы к более неупорядоченному состоянию. В зависимости от того, управляется процесс изменением энтальпии или энтропии, характер взаимодействия и состояние образовавшегося комплекса будет различным.

В наших опытах изменение свободной энергии рассчитывали на основе значений констант взаимодействия K , приведенных в табл. 1, в соответствии с формулой:

$$\Delta G = -2,303 R T \log K, \quad (4)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – температура, при которой протекает взаимодействие, выраженная в градусах Кельвина.

Исследование связывания лекарственных веществ с альбумином проводили при разных температурах реакционной смеси, что позволило рассчитать изменения энтальпии и энтропии системы. Для расчета использовали уравнение Вант-Гоффа:

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (5)$$

где ΔH и ΔS – соответственно изменение энтальпии и энтропии.

Решение получали графическим способом в системе координат $\ln K$ от $\frac{1}{T}$, где T – температура реакционной смеси в градусах Кельвина. Из накло-

на графика получали отношение $-\frac{\Delta H}{R}$, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, давал отношение $\frac{\Delta S}{R}$. Результаты, полученные при расчете термодинамических параметров, приведены в табл. 2.

Как видно из таблицы, при связывании всех исследованных веществ с альбумином происходит снижение стандартной свободной энергии, что говорит о самопроизвольном протекании процесса. Величины ΔG имеют наибольшие по модулю значения для препаратов, активно связывающихся с альбумином, что вполне логично, исходя из формулы 4. Для понимания природы взаимодействий лигандов с альбумином необходимо установить, за счет каких процессов происходит выход свободной энергии. Ответ на этот вопрос позволит составить представление о типе химических связей, участвующих в образовании лиганд-протеинового комплекса.

P. D. Ross и S. Subramanian проанализировали изменения термодинамических параметров при взаимодействии малых органических молекул с биомолекулами и сделали обобщения, которые позволяют судить о типе вовлеченных химических связей по характеру изменения энтальпии и энтропии в ходе реакции [22]. В табл. 3, согласно концепции авторов, приведены термодинамические паттерны, характерные для того или иного типа взаимодействий лигандов с макромолекулами.

Представляется, что для анализа взаимодействия лигандов с альбумином не столь важно определить, происходит связывание при участии вандерваальсовых сил или водородных связей. Гораздо важнее установить, каким термодинамическим процессом управляется данное взаимодействие.

Согласно закону Гесса, изменение ΔG определяется отношением $\frac{|\Delta H|}{|T\Delta S|}$. Учитывая, что при самопроизвольном протекании реакций, к коим относится и связывание лигандов с альбумином, свободная энергия системы уменьшается ($\Delta G < 0$), характерные

Таблица 2

Термодинамические характеристики связывания лекарственных веществ с сывороточным альбумином в экспериментах *in vitro*

Лекарственные вещества	ΔG_{25° , кДж·М ⁻¹	ΔG_{37° , кДж·М ⁻¹	ΔH , кДж·М ⁻¹	ΔS , кДж·М ⁻¹ ·К ⁻¹	$\frac{ \Delta H }{ T\Delta S }_{25}$	$\frac{ \Delta H }{ T\Delta S }_{37}$
Атенолол	-14,39	-13,10	-46,44	-0,108	1,45	1,39
Варфарин	-33,64	-34,05	-23,49	0,034	2,32	2,23
Фенилбутазон	-29,33	-31,10	14,41	0,147	0,33	0,32
Ибупрофен	-37,06	-35,87	-66,74	-0,099	2,25	2,16

Примечание. Нижние индексы при обозначениях термодинамических параметров указывают на температуру, при которой проводилось измерение.

Таблица 3

Изменения термодинамических параметров характер вовлеченных взаимодействий при связывании лигандов с макромолекулами (по P.D. Ross, S. Subramanian, 1981 [22])

Характер взаимодействия	ΔH	ΔS
Гидрофобное взаимодействие	> 0	> 0
Силы Ван-дер-Ваальса	< 0	< 0
Образование водородных связей	< 0	< 0
Ионные взаимодействия (нейтрализация заряда)	~ 0	> 0
Протонирование	< 0	< 0

изменения энтальпии и энтропии можно представить в виде трех общих случаев, описанных в табл. 4.

Рассмотрим первый случай, когда $\Delta H < 0$ и $T\Delta S < 0$. Оба параметра располагаются на числовой оси слева от нуля, как показано в таблице. Следует отметить, что относительно друг друга на числовой оси $T\Delta S$ всегда будет располагаться справа от ΔH , в противном случае ΔG приобретает положительные значения, что противоречит результатам экспериментов. При таком расположении $|\Delta H|$ будет всегда больше $|T\Delta S|$, соответственно отношение между ними будет > 1 .

Второй случай: $\Delta H > 0$ и $T\Delta S > 0$. При расположении изменений энтальпии и энтропии справа от нуля на числовой оси $|\Delta H|$ всегда будет меньше $|T\Delta S|$, соответственно отношение между ними будет больше 0, но меньше 1.

Третий случай, когда $\Delta H < 0$ и $T\Delta S > 0$ и параметры находятся на числовой оси по разные стороны от нуля, либо $\Delta H > 0$ и $T\Delta S < 0$ и оба находятся в положительной области, но поблизости друг от друга. В данном случае абсолютные значения параметров будут близки, и соответственно отношение между ними будет близким к 1.

Вариант третьего случая, когда ΔH и $T\Delta S$ близки, но оба больше 0, на первый взгляд может показаться частным случаем второго взаимодействия, однако, согласно P. D. Ross и S. Subramanian, он характеризуется принципиально иными, нежели во втором случае, взаимодействиями. Чтобы разделить все три описанных модели, мы априорно ввели граничные условия, которые приведены в столбце 5 табл. 4. В соответствии с этими условиями, лиганд-альбуминовые взаимодействия по характеру термодинамических изменений, определяющих протекание процесса, можно разделить три типа: 1 – взаимодействие, движимое изменением энтальпии; 2 – взаимодействие, протекающее с преимущественным изменением энтропии; 3 – с равноценным вкладом изменений энтальпии и энтропии.

В соответствии с этими представлениями, связывание варфарина и ибупрофена происходит за счет преимущественного изменения энтальпии, взаимодействие фенилбутазона с альбумином относится к энтропийно-управляемым процессам, а при связывании атенолола вклад обоих термодинамических параметров равнозначен. Обращает на себя внимание тот факт, что высокоэффективное связывание лигандов с альбумином может происходить как по энтальпийному (варфарин, ибупрофен), так и по энтропийному (фенилбутазон) типу. Это говорит о том, что эффективное связывание с альбумином может управляться различными термодинамическими процессами.

Возвращаясь к представлениям P. D. Ross и S. Subramanian о характере термодинамических сдвигов и типе химических связей, вовлеченных во взаимодействие [22], можно предположить, что варфарин и ибупрофен связываются с альбумином посредством вандерваальсовых взаимодействий или водородных связей. При связывании фенилбутазона существенная роль принадлежит гидрофобным взаимодействиям. Хотя при связывании варфарина вклад гидрофобного взаимодействия, вероятно, также имеет место, поскольку, несмотря на ведущую

Таблица 4

Соотношение термодинамических параметров и типы взаимодействия лекарственных веществ с альбумином

№	Изменение параметров в эксперименте	Положение параметров на числовой оси	Соотношение параметров	Границы отношений параметров	Тип взаимодействия
1	$\Delta H < 0$ $T\Delta S < 0$		$ \Delta H > T\Delta S $	$\left \frac{\Delta H}{T\Delta S} \right > 1,5$	Энтальпийный
2	$\Delta H > 0$ $T\Delta S > 0$		$ T\Delta S > \Delta H $	$0 < \left \frac{\Delta H}{T\Delta S} \right < 0,67$	Энтропийный
3	$\Delta H < 0$ $T\Delta S > 0$ ÷ $\Delta H > 0$ $T\Delta S < 0$		$ \Delta H \sim T\Delta S $	$0,67 \leq \left \frac{\Delta H}{T\Delta S} \right \leq 1,5$	Равнозначный

роль энтальпии, энтропия все же демонстрирует положительный сдвиг, характерный для гидрофобных взаимодействий. Роль гидрофобных взаимодействий в процессе связывания варфарина и фенилбутазона представляется вполне закономерной, учитывая, что местом связывания обоих лигандов на молекуле альбумина является сайт I, имеющий гидрофобную область. Сайт II, с которым связывается ибупрофен, представляет собой достаточно узкий гидрофобный карман, у входа в который расположены остатки Lis-194 и Arg-145, несущие катионные группы [17]. Вероятно, по этой причине водородные связи и протонирование выступают на первый план. Наконец, при взаимодействии атенолола с альбумином вступают в действие ионные механизмы, однако распределение заряженных групп в молекуле лиганда, видимо, не является благоприятным для образования устойчивых связей с белком.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования показали, что метод флуоресцентной спектроскопии может привлекаться для исследования связывания лекарств с альбумином. С использованием флуоресцентного анализа могут быть получены информативные параметры связывания, включая константы взаимодействия, число центров связывания лиганда, изменение термодинамических характеристик в ходе образования лиганд-протеинового комплекса.

Анализ механизма взаимодействия лекарств с альбумином с использованием термодинамического подхода показал, что связывание имеет сложный характер и при одинаковом значении констант взаимодействия может происходить за счет как гидрофобного взаимодействия, так и водородных, донорно-акцепторных и вандерваальсовых связей.

Использование флуоресцентной спектроскопии в комплексе с термодинамическим анализом дает возможность получить важные сведения о механизме лиганд-альбуминовых взаимодействий и о характере вовлеченных химических связей. Полученные сведения могут быть использованы в фармакокинетических исследованиях, при анализе лекарственных взаимодействий, а также при разработке новых лекарственных веществ.

Литература

1. Винникова А.В., Тринус Ф.П., Денисов Н.Д., Луйк А.И. Связывание мифенаминовой кислоты плазмой крови и гомогенатами органов // Фармакол. и токсикол. 1980. Т. 43. № 2. С. 187–102.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 485 с.
3. Маркович М.Н., Рудзит Э.А., Ландау М.А. Молекулярные аспекты взаимодействия пенициллинов с сывороточным альбумином // Антибиотики. 1978. № 2. С. 654–666.
4. Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест: Изд-во Академии Соц. Республики Румыния, 1975. 183 с.
5. Энциклопедия лекарств. 12-й вып. / Гл. ред. Г.Л. Вышковский. М.: РЛС-2005, 2004. 1440 с.
6. Aarons L. Kinetics of drug–drug interactions // Pharmacol. Ther. 1981. Vol. 14. № 3. P. 321–344.
7. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin // Adv. Protein. Chem. 1994. Vol. 45. P. 153–203.
8. Chadborn N., Bryant J., Bain A.J., O'Shea P. Ligand-dependent conformational equilibria of serum albumin revealed by tryptophan fluorescence quenching // Biophys. J. 1999. Vol. 76. № 4. P. 2198–2207.
9. Fehske K.J., Schlafer U., Wollert U., Muller W.E. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone // Mol. Pharmacol. 1982. Vol. 21. № 2. P. 387–393.
10. Ferrer M.L., Duchowicz R., Carrasco B., de la Torre J.G., Acuna A.U. The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization – hydrodynamic modeling study // Biophys. J. 2001. Vol. 80. № 5. P. 2422–2430.
11. Gelamo E.L., Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants // Spectrochim. Acta. Part A. 2000. Vol. 56. № 11. P. 2255–2271.
12. Gibaldi M., Koup J.R. Pharmacokinetic concepts – drug binding, apparent volume of distribution and clearance // Eur. J. Clin. Pharmacol. 1981. Vol. 20. № 4. P. 299–305.
13. Huang Y., Zhang Z. Binding study of drug with bovine serum albumin using a combined technique of microdialysis with flow-injection chemiluminescent detection // J. Pharm. Biomed. Anal. 2004. Vol. 35. № 5. P. 1293–1299.
14. Jiang M., Xie M.X., Zheng D. et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin // J. Mol. Struct. 2004. Vol. 692. № 1–3. P. 71–80.
15. Kamal J.K.A., Zhao L., Zewail A.H. Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. № 37. P. 13411–13416.
16. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin // Pharmacol. Rev. 1981. Vol. 33. № 1. P. 17–53.
17. Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin // Biol. Pharm. Bull. 2002. Vol. 25. № 6. P. 695–704.
18. Parikh H.H., McElwain K., Balasubramanian V. et al. A rapid spectrofluorimetric technique for determining drug-serum protein binding suitable for high-through-

- put screening // *Pharm. Res.* 2000. Vol. 17. № 5. P. 632–637.
19. Perucca E., Richens A. Interpretation of drug levels: relevance of plasma protein binding // *Ciba Found. Symp.* 1979. Vol. 74. P. 51–68.
20. Peters T., Jr. All about albumin: biochemistry, genetics and medical application. San Diego: Academic Press, 1996.
21. Peyre V., Lair V., Andre V. et al. Detergent binding as a sensor of hydrophobicity and polar interactions in the binding cavities of proteins // *Langmuir.* 2005. Vol. 21. № 19. P. 8865–8875.
22. Ross P.D., Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contribution to stability // *Biochemistry.* 1981. Vol. 20. № 11. P. 3096–3102.
23. Seedher N., Bhatia S. Mechanism of interaction of the non-steroidal antiinflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005. Vol. 39. № 1–2. P. 257–262.
24. Seetharamappa J., Kamat B.P. Spectroscopic studies on the mode of interaction of an anticancer drug with bovine serum albumin // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2004. Vol. 52. № 9. P. 1053–1057.
25. Seydel J.K., Schaper K.J. Quantitative structure-pharmacokinetic relationships and drug design // *Pharmacol. Ther.* 1981. Vol. 15. № 2. P. 131–182.
26. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. Spectroscopic techniques in the study of protein binding: A fluorescence technique for the evaluation of the albumin binding and displacement of warfarin and warfarin-alcohol // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1975. Vol. 2. № 2. P. 129–140.
27. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Cristal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // *Prot. Engineering.* 1999. Vol. 12. № 6. P. 439–446.
28. Tian J.N., Liu J.Q., Zhang J.Y. et al. Fluorescence studies on the interactions of barbaloin with bovine serum albumin // *Chem. Pharm. Bull.* 2003. Vol. 51. № 5. P. 579–582.
29. Trivedi V.D., Saxena I., Siddiqui M.U., Qasim M.A. Interaction of bromocresol green with different serum albumins studied by fluorescence quenching // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. Vol. 43. № 1. P. 1–8.
30. Wang N., Ye L., Zhao B.Q., Yu J.X. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2008. Vol. 41. № 7. P. 589–595.
31. Zhang Y.-Z., Zhou B., Liu Y.-X. et al. Fluorescence study on the interaction of bovine serum albumin with p-aminoazobenzene // *J. Fluoresc.* 2008. Vol. 18. № 1. P. 109–118.

Представлена академиком РАМН Г. А. Софроновым