

НАНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ФЛУОРИМЕТРИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В ПРИСУТСТВИИ НР β CD НА ДЕНАТУРАЦИЮ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ВОДНО-ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДНЫХ РАСТВОРАХ

Т.Р. Усачева, Н.Н. Куранова, Д.А. Алистер

Татьяна Рудольфовна Усачева (ORCID 0000-0002-0840-4275)*, Наталия Николаевна Куранова (ORCID 0000-0001-7067-6741), Диана Александровна Алистер (ORCID 0000-0003-4758-435X)

Кафедра общей химической технологии, Ивановский государственный химико-технологический университет, пр. Шереметевский, 7, Иваново, Российская Федерация, 153000

E-mail: oxt@isuct.ru*, kuranova_nn@isuct.ru, alister_da@isuct.ru

В данной работе изучено влияние добавок полифенолов куркумина, рутина, кверцетина и их комплексов с гидроксипропил- β -циклодекстрином на структуру и температуру денатурации человеческого сывороточного альбумина в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 3,4% и 8 об.% диметилсульфоксида в фосфатном буфере при pH=7,0. Исследование проводили с использованием системы экспресс-анализа качества белков NanoTemper Tucho NT.6. В основе работы Tucho NT.6 лежит метод нано-дифференциальной сканирующей флуориметрии, позволяющей детектировать конформационную и коллоидную стабильность белков. Мониторинг изменения структуры белка проводили по температуре, соответствующей точкам «перегиба» термической зависимости интенсивности флуоресценции. При добавлении полифенолов к человеческому сывороточному альбумину наблюдается увеличение температуры перегиба. Равномерно снижается процент совпадения кривой термического профиля с референсным образцом. Взаимодействие кверцетина, куркумина и рутина с человеческим сывороточным альбумином приводит к изменению структурной целостности белка в присутствии гидроксипропил- β -циклодекстрина. Установлено, что в отсутствие гидроксипропил- β -циклодекстрина интенсивность флуоресценции человеческого сывороточного альбумина снижается с ростом концентрации куркумина, рутина, кверцетина. В присутствии комплексов флавоноидов с гидроксипропил- β -циклодекстрином интенсивность флуоресценции человеческого сывороточного альбумина почти не зависит от концентрации фенольных молекул. Сделано предположение о том, что исследуемые молекулярные комплексы меньше изменяют структуру человеческого сывороточного альбумина по сравнению с полифенолами в свободном состоянии. Интенсивность флуоресценции человеческого сывороточного альбумина без добавок полифенолов сопоставима с интенсивностью флуоресценции человеческого сывороточного альбумина в присутствии гидроксипропил- β -циклодекстрина. Этот результат может косвенно подтверждать отсутствие взаимодействия циклодекстрина с человеческим сывороточным альбумином в рассматриваемых условиях, что согласуется с полученными ранее результатами.

Ключевые слова: полифенолы, циклодекстрины, человеческий сывороточный альбумин, комплексообразование, дифференциальная сканирующая флуориметрия, солубилизация

Для цитирования:

Усачева Т.Р., Куранова Н.Н., Алистер Д.А. Нано-дифференциальная сканирующая флуориметрия для изучения влияния полифенолов в присутствии НР β CD на денатурацию человеческого сывороточного альбумина в водно-диметилсульфоксидных растворах. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2023. Т. 66. Вып. 9. С. 56–64. DOI: 10.6060/ivkkt.20236609.6827.

For citation:

Usacheva T.R., Kuranova N.N., Alister D.A. Nano-differential scanning fluorimetry for studying the effect of polyphenols in the presence of НР β CD on human serum albumin denaturation in aqueous-dimethyl sulfoxide solutions. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2023. V. 66. N 9. P. 56–64. DOI: 10.6060/ivkkt.20236609.6827.

NANO-DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY FOR STUDYING THE EFFECT OF POLYPHENOLS IN THE PRESENCE OF HP β CD ON HUMAN SERUM ALBUMIN DENATURATION IN AQUEOUS-DIMETHYL SULFOXIDE SOLUTIONS

T.R. Usacheva, N.N. Kuranova, D.A. Alister

Tatiana R. Usacheva (ORCID 0000-0002-0840-4275)*, Natalia N. Kuranova (ORCID 0000-0001-7067-6741), Diana A. Alister (ORCID 0000-0003-4758-435X)

Department of General Chemical Technology, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Shere-metevskiy ave., 7, Ivanovo, 153000, Russia

E-mail: oxt@isuct.ru*, kuranova_nn@isuct.ru, alister_da@isuct.ru

In this work, we studied the effect of additions of curcumin, rutin, quercetin and their complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the structure and denaturation temperature of human serum albumin in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 3.4% and 8 vol% dimethyl sulfoxide, in phosphate buffer at pH=7.0. The study was carried out using the NanoTemper Tycho NT.6 for rapid protein quality analysis system. The principle Tycho NT.6 is based on the nano-differential scanning fluorimetry, which makes it possible to detect the conformational and colloidal stability of proteins. Changes in the protein structure were monitored by the temperature corresponding to the “inflection” points of the thermal dependence of the fluorescence intensity. When flavonoids are added to human serum albumin, an increase in the inflection temperature is observed. The percentage of coincidence of the thermal profile curve with the reference sample is evenly reduced. The interaction of quercetin, curcumin and rutin with human serum albumin leads to a change in the structural integrity of the protein in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. It was found that in the absence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, the intensity of human serum albumin fluorescence decreases with increasing concentrations of curcumin, rutin, quercetin. In the presence of complexes of flavonoids with hydroxypropyl- β -cyclodextrin, the intensity of human serum albumin fluorescence is almost independent of the concentration of curcumin, rutin and quercetin. It has been suggested that molecular complexes of flavonoids change the structure of human serum albumin less than flavonoids in their free states. The fluorescence intensity of human serum albumin without flavonoids is comparable to the fluorescence intensity of human serum albumin in the presence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin. This result may indirectly confirm the absence of interaction between cyclodextrin and human serum albumin under the conditions under consideration, which is consistent with previous results.

Key words: polyphenols, cyclodextrins, human serum albumin, complexation, differential scanning fluorimetry, solubilization

ВВЕДЕНИЕ

Информация о влиянии молекулярного состава фармацевтических композиций на структуру белков является составной частью тестирования фармпрепаратов на всех стадиях их разработки. Природные полифенольные биомолекулы, обладающие антиоксидантными свойствами, представляются перспективными при использовании в качестве активных компонентов лекарственных препаратов [1, 2].

Куркумин (Curc), рутин (RU), кверцетин (QCT) относятся к классу природных полифенолов, которые обладают высокой антиоксидантной способностью и уже применяются в протоколах лечения дегенеративных и онкологических заболева-

ний [2, 3]. В частности, куркумин обладает выраженным противовоспалительным эффектом, активизирует процессы роста нервных клеток, повышает нейропластичность, способствует гибели раковых клеток и повышению эффективности лечения [4, 5]. Кверцетин может блокировать свободные радикалы, восстанавливать ткани и повреждение ДНК, повышать антиоксидантную защиту против широкого спектра заболеваний, связанных с окислительным стрессом [6, 7]. Рутин обладает способностью укреплять и модулировать проницаемость стенок кровеносных сосудов, защищает повреждение ДНК от про-канцерогенов в клетках печени [8].

Применение полифенолов ограничено их гидрофобностью и, как следствие, низкой биодо-

ступностью. Циклодекстрины (CD) способны образовывать комплексы включения с различными гидрофобными веществами, делая тем самым последние растворимыми в водных средах. В комплексах включения также устойчивы полифенолов к гидролизу, термо- и окислительной деградации [7].

Биологическая функция сывороточного альбумина человека (HSA) состоит в транспорте эндо- и экзогенных гидрофобных веществ по кровяному руслу к месту их метаболической трансформации под действием цитохрома P450 в печени. Таким образом, HSA и CD могут выполнять одну и ту же функцию – солюбилизируют гидрофобные вещества в водных растворах.

Улучшить уникальные свойства CD как солюбилизаторов гидрофобных органических молекул возможно за счет целенаправленного использования растворителя в процессах комплексообразования. Изменение состава растворителя приведет к изменению сольватного состояния реагентов и их реакционной способности, что, в свою очередь, отразится на устойчивости комплексов и термодинамических параметрах комплексообразования. Однако белковые молекулы денатурируют в неводных средах, поэтому применение водно-органических растворов должно сопровождаться контролем стабильности структуры белков в используемом диапазоне концентраций неводных компонентов.

Одним из растворителей, широко используемых в медицинских технологиях, является диметилсульфоксид (ДМСО). ДМСО входит в состав некоторых препаратов, обладает анальгетическим и противовоспалительным действием и способен усиливать проникновение через биологические мембраны ряда лекарственных веществ, увеличивая тем самым их биодоступность [9-13].

Ранее в работе [14] калориметрическим и флуориметрическим методами нами было исследовано образование ассоциатов человеческого сывороточного альбумина (HSA) с кверцетином и куркумином в водно-диметилсульфоксидных растворах с небольшими добавками ДМСО до 0,1 мол.д. на фоне фосфатного буфера с pH 7,4. Содержание ДМСО выше, чем 0,1 мол.д., приводит к денатурации белка [15]. Установлено, что в растворителе H₂O-ДМСО состава 0,05 мол.д. ДМСО устойчивость ассоциатов HSA – QCT $\lg K = 5,75 \pm \pm 0,03$ и HSA – Curc $\lg K = 4,74 \pm 0,10$, что несколько выше, чем в воде и в растворителе с содержанием 0,1 мол.д. ДМСО. Устойчивость ассоциата HSA с кверцетином выше, чем с куркумином во всех со-

ставах водно-диметилсульфоксидного растворителя. Циклодекстрин не взаимодействует с HSA, как было установлено при проведении отдельного эксперимента в работе [14]. Вероятно, исходя из структуры HSA и HPβCD, они не могут взаимодействовать друг с другом, а будут конкурировать за связывание гидрофобных веществ. Полученные в [14] значения констант устойчивости ассоциатов HSA с кверцетином и куркумином в воде, в общем, согласуются с данными ряда работ по взаимодействиям человеческого сывороточного альбумина и бычьего сывороточного альбумина с флавоноидами [16-22].

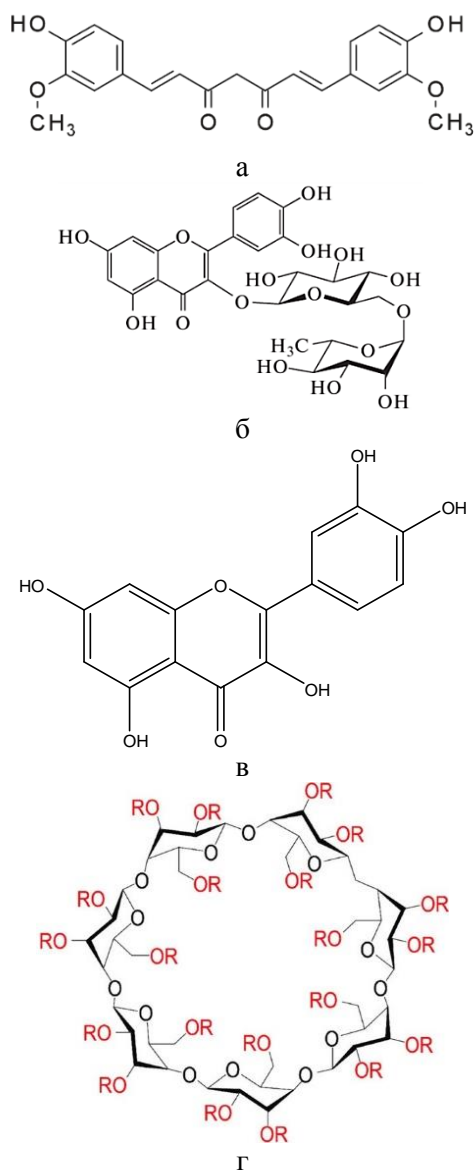


Рис. 1. Структурные формулы куркумина (а), рутина (б), кверцетина (в) и гидроксипропил-β-циклодекстрина (г)
Fig. 1. Structural formulas of curcumin (a), rutin (б), quercetin (в), and hydroxypropyl-β-cyclodextrin (r)

В продолжение исследований [14, 18-24] в данной работе методом нано-дифференциальной сканирующей флуориметрии с использованием системы экспресс-анализа качества белков NanoTemper Tucho NT.6 изучено влияние добавок Curc, RU, QCT и их комплексов с гидроксипропил- β -циклодекстрином (HP β CD) на температуру денатурации человеческого сывороточного альбумина (HSA) в водно-диметилсульфоксидных растворах. Результаты изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации полифенолов, традиционно получаемые методом флуоресценции, дополнены информацией о температурах денатурации растворов HSA в присутствии Curc, RU, QCT и их комплексов с HP β CD. Предложены корреляции изменения структуры белка и температуры, соответствующей точкам «перегиба» термической зависимости интенсивности флуоресценции.

Структурные формулы исследуемых молекул представлены на рис. 1.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследование проводили с использованием системы экспресс-анализа качества белков NanoTemper Tucho NT.6. В основе работы Tucho NT.6 лежит метод нано-дифференциальной сканирующей флуориметрии. Техника nanoDSF детектирует внутреннюю флуоресценцию триптофана и тирозина белков на длинах волн 330/350 нм. Взаимная интенсивность пиков чувствительна к изменению конформации белка и меняется при термической денатурации. Этот метод способен анализировать конформационную и коллоидную стабильность белков. Конформационная стабильность белка описывается его средней температурой денатурации T_m ($^{\circ}\text{C}$), которая является точкой, где разворачивается половина белка. Оборудование Tucho NT.6 рекомендуется при проведении валидации экспериментальных партий образцов, анализа фракций во время очистки пептидов/белков, для определения надлежащих условий хранения/анализа и функциональности (то есть связывания лигандов и т.д.), анализа жидких биофармацевтические препаратов, изучения стабильности белков и фолдинга. В нашей работе Tucho NT.6 был применен для исследования влияния RU, QCT и Curc на структуру HSA в водно-органических средах.

Рутин производства фирмы «AK Scientific» США с содержанием RUT $\geq 97\%$ использовали без дополнительной очистки. Кверцетин производства «Sigma-Aldrich» США с содержанием QCT $\geq 95\%$ использовали без дополнительной очистки. Куркумин производства «Acros organics» с содержанием

HP β -CD $\geq 98\%$ использовали без дополнительной очистки. Гидроксипропил- β -циклодекстрин производства «Acros organics» с содержанием HP β CD $\geq 97\%$ использовали без дополнительной очистки. HSA произведен «Sigma-Aldrich» США с содержанием HSA $\geq 96\%$. Диметилсульфоксид (АО Экос-1, Россия х.ч.) использовали без дополнительной очистки, остаточная концентрация воды (0,20% масс.) контролировалась по методу Фишера.

Растворы готовили весовым способом на основе свежеперегнанного водного бидистиллята ($\kappa = 1,7$ мкСм/см, pH = 6,6) непосредственно перед измерениями. Для приготовления растворов навески взвешивали на аналитических весах марки SHIMADZU AUW-220D, точность взвешивания составляла $\pm 0,00005$ г.

Таблица 1

Концентрационные условия сканирования и значения температур денатурации растворов HSA при различных концентрациях Curc и HP β CD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер)

Table 1. Concentration scanning conditions and denaturation temperatures of HSA solutions at various concentrations of Curc and HP β CD in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer)

Номер образца	Концентрация			T ₁	T ₂	T ₃
	HSA, мкмоль/л	Curc, мкмоль/л	HP β CD, мкмоль/л			
1	14,37	0	0	58,5	67,0	77,7
2	14,37	11,76	0	63,2	66,4	78,3
3	14,37	23,53	0	63,2		78,1
4	14,37	35,29	0	63,0	76,4	79,4
5	14,37	47,05	0	63,0		78,6
6	14,37	58,82	0	63,0		
1a	14,37	23,53	0	63,3	67,3	78,1
2a	14,37	23,53	13,94	62,8	67,0	77,4
3a	14,37	23,53	41,81	63,2	66,9	78,0
4a	14,37	23,53	69,68	63,0	77,5	
5a	14,37	0	69,68	58,4	66,7	78,7

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Термическая денатурация HSA при различных концентрациях Curc и HP β CD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об. % ДМСО, pH = 7,0 (фосфатный буфер)

Исследуемые растворы содержали постоянную концентрацию HSA (14,37 мкмоль/л). Концентрация Curc и HP β CD варьировалась от 0 до пятикратного избытка над HSA. Использовали фосфатный буфер с pH = 7,0, в качестве соразстворителя – 8 об. % ДМСО. Состав растворителя во всех

пробах поддерживался постоянным. Сканирования растворов HSA в ДМСО (8 об. %), приготовленных за сутки, и приготовленных непосредственно перед проведением экспериментов, выявили их идентичность друг другу. Мониторинг изменения структуры белка проводили по температуре, соответствующей точкам «перегиба» термической зависимости интенсивности флуоресценции.

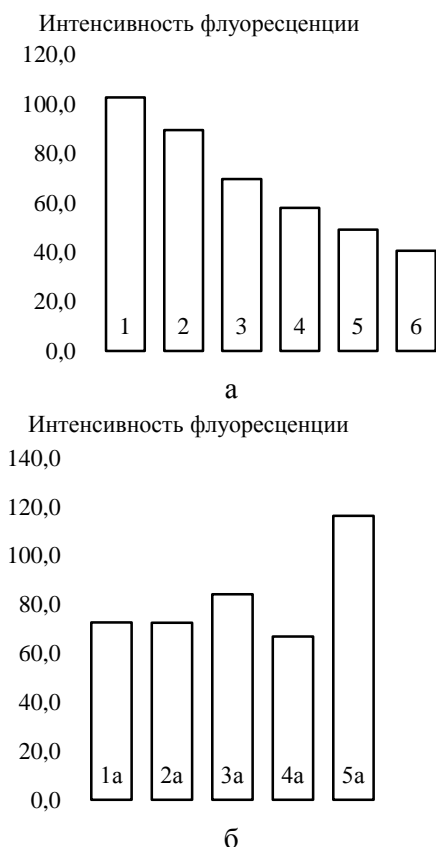


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции растворов HSA при различных концентрациях Curc в отсутствие HPβCD (а) и в присутствии HPβCD (б) в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об. % ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствует нумерации, приведенной в Табл. 1

Fig. 2. Sample brightness of HSA solutions at different concentrations of Curc in the absence of HPβCD (a), and in the presence of HPβCD (b) in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). The numbering of the samples and the concentration conditions of the solutions correspond to the numbering given in Table 1

Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 2, 3. Образцы 3 и 1a идентичны и являются референсными для серии опытов с добавлением куркумина, связанного в комплексное соединение с гидроксипропил-β-циклодекстрином.

Структурно-термические характеристики образцов 1a, 2a, 4a изменяются в пределах погрешности измерений. Добавление гидроксипропил-β-

циклодекстрина к HSA не приводит к существенным изменениям в его структуре. Этот результат может косвенно подтверждать отсутствие взаимодействия циклодекстрина с HSA в рассматриваемых условиях.

При добавлении куркумина к образцу альбумина наблюдается увеличение температуры перегиба (табл. 1, рис. 2, 3). Равномерно снижается процент совпадения кривой термического профиля с референсным образцом (кр. 1) (рис. 3).

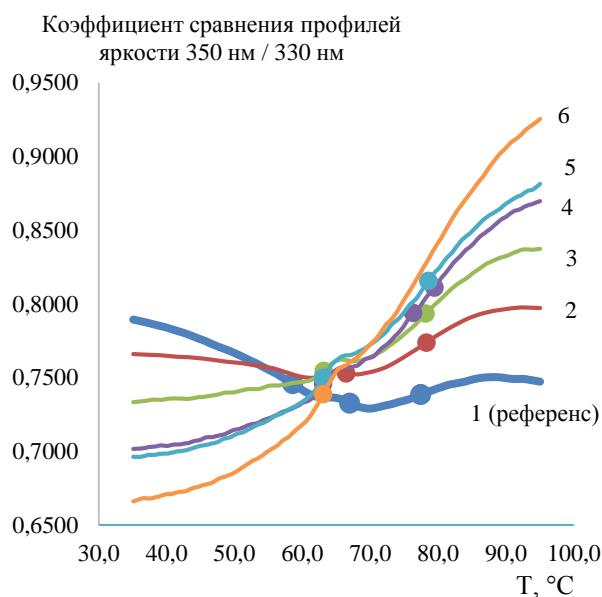


Рис. 3. Динамика соотношений внутренней флуоресценции триптофана и тирозина HSA при длинах волн 330/350 нм в зависимости от температуры и концентрации куркумина в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об. % ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствуют нумерации, приведенной в Табл. 1

Fig. 3. Dynamics of ratios of internal fluorescence of tryptophan and tyrosine HSA at a wavelength of 330/350 nm depending on the temperature and concentration of curcumin in aqueous dimethyl sulfoxide solutions with the presence of 8 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). Sample numbering and concentration conditions correspond to those dissolved in Table 1

Интенсивность флуоресценции снижается с ростом концентрации куркумина (в отсутствие HPβCD). Взаимодействие Curc с HSA приводит к изменению структурной целостности белка в присутствии HPβCD, однако влияние самого HPβCD на изменение структуры белка не установлено.

Термическая денатурация HSA при различных концентрациях QCT и HPβCD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об. % ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер)

Результаты и концентрационные условия представлены в табл. 2, на рис. 4 (а, б) и 5.

Таблица 2

Концентрационные условия сканирования и значения температур денатурации растворов HSA при различных концентрациях QCT и HPβCD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер)

Table 2. Concentration scanning conditions and denaturation temperatures of HSA solutions at different concentrations of QCT and HPβCD in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer)

Номер образца	Концентрация			T ₁	T ₂	T ₃
	HSA, мкмоль/л	QCT, мкмоль/л	HPβCD, мкмоль/л			
10	14,37	0	0	62,1	66,1	78,0
11	14,37	9,82	0	61,8	66,6	76,2
12*	14,37	19,63	0	62,1	67,0	75,0
13	14,37	29,45	0	62,9	67,6	76,5
14	14,37	39,27	0	62,8	67,3	76,5
15	14,37	49,08	0	62,6	67,4	76,4
10a*	14,37	19,63	0	62,2	66,9	76,9
11a	14,37	19,63	13,94	63,4	67,6	76,3
12a	14,37	19,63	41,81	63,0	75,2	-
13a	14,37	19,63	69,68	62,9	67,7	76,8
14a	14,37	0	69,68	63,0	66,8	77,5

Примечание: *Образцы 12 и 12a идентичны и являются референсными для серии опытов с добавлением кверцетина, связанного в комплексное соединение с гидроксипропил-β-циклодекстрином

Note: samples 12 and 12a are the same and they are reference for series of experiences with addition of quercetin bonded into complex compound with hydroxypropyl-β-cyclodextrin

Таблица 3

Концентрационные условия сканирования и значения температур денатурации растворов HSA при различных концентрациях RU и HPβCD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 3,4 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер)

Table 3. Concentration scanning conditions and denaturation temperatures of HSA solutions at various concentrations of RU and HPβCD in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 3.4 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer)

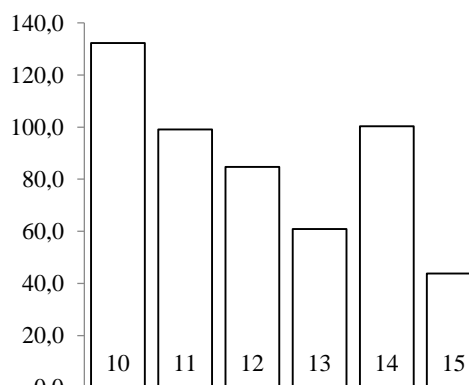
Номер образца	Концентрация			T ₁	T ₂	T ₃
	HSA, мкмоль/л	RU, мкмоль/л	HPβCD, мкмоль/л			
20	6,16	0	0	60,0	67,5	80,2
21	6,16	4,36	0	59,9	67,6	78,4
22*	6,16	8,71	0	60,1	67,6	77,4
23	6,16	13,07	0	59,8	67,9	-
24	6,16	17,43	0	49,5	59,6	68,0
25	6,16	21,79	0	64,9	68	78,6
20a*	6,16	8,71	0	60,1	67,6	78,9

21a	6,16	8,71	5,97	59,6	67,8	80,8
22a	6,16	8,71	17,92	59,7	67,5	-
23a	6,16	8,71	29,86	59,5	67,8	78,2
24a	6,16	0	29,86	59,3	91,9	-

Примечание: *Образцы 22 и 22a идентичны и являются референсными для серии опытов с добавлением рутина, связанного в комплексное соединение с гидроксипропил-β-циклодекстрином

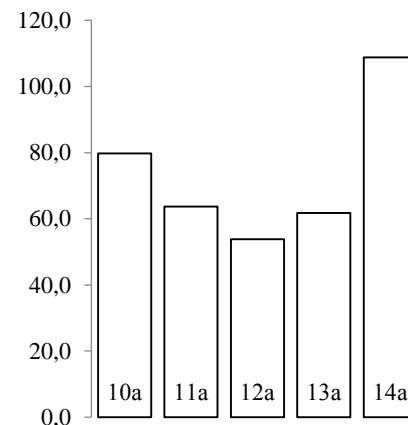
Note: samples 22 and 22a are the same and they are reference for series of experiences with addition of rutin bonded into complex compound with hydroxypropyl-β-cyclodextrin

Интенсивность флуоресценции



а

Интенсивность флуоресценции



б

Рис. 4. Интенсивность флуоресценции растворов HSA при различных концентрациях QCT в отсутствие HPβCD (а) и в присутствии HPβCD (б) в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствует нумерации, приведенной в Табл. 2
Fig. 4. Sample brightness of HSA solutions at various concentrations of QCT in the absence of HPβCD (a) and in the presence of HPβCD (b) in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). The numbering of the samples and the concentration conditions of the solutions correspond to the numbering given in Table 2

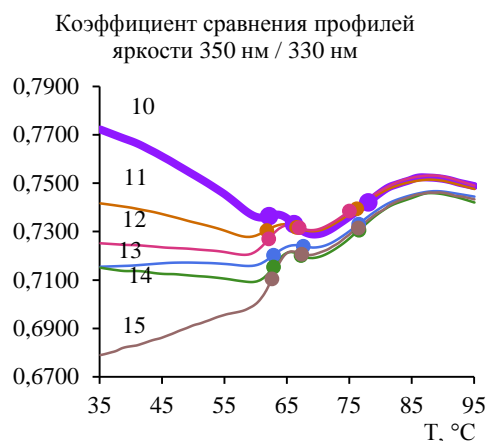


Рис. 5. Динамика соотношений внутренней флуоресценции триптофана и тирозина HSA при длинах волн 330/350 нм в зависимости от температуры и концентрации кверцетина в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствует нумерации, приведенной в Табл. 2

Fig. 5. Dynamics of ratios of internal fluorescence of tryptophan and tyrosine HSA at wavelengths of 330/350 nm depending on temperature and concentration of quercetin in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). The numbering of the samples and the concentration conditions of the solutions correspond to the numbering given in Table 2

Термическая денатурация HSA при различных концентрациях RU и HPβCD в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 3,4 об. % ДМСО, pH = 7,0 (фосфатный буфер)

Концентрационные условия и результаты эксперимента представлены в табл. 3, на рис. 6 (а, б), 7.

При добавлении полифенолов к HSA наблюдается увеличение температуры перегиба (табл. 1-3). Равномерно снижается процент совпадения кривой термического профиля с референсным образцом. Взаимодействие QCT, Curc и RU с HSA приводит к изменению структурной целостности белка в присутствии HPβCD.

Взаимодействие гидрофобных веществ как с HSA, так и с HPβCD приводит к изменению конформации последних. Связывание гидрофобных веществ с HSA происходит в «гидрофобном кармане», рядом с которым располагается единственный остаток триптофана (Trp214). Результатом такого связывания является концентрационно зависимое тушение триптофановой флуоресценции. Этот эффект был, в целом, подтвержден в полученных нами результатах этой работы на основе детектирования внутренней флуоресценции триптофана и тирозина белков: в отсутствие HPβCD интенсивность флуоресценции HSA снижается с ростом концентрации Curc, RU, QCT. Однако в присут-

ствии комплексов флавоноидов с HPβCD интенсивность флуоресценции HSA почти не зависит от концентрации Curc, RU и QCT. Вероятно, молекулярные комплексы флавоноидов меньше изменяют структуру HSA по сравнению с флавоноидами в свободном состоянии. Интенсивность флуоресценции HSA без добавок сопоставима с интенсивностью флуоресценции HSA в присутствии HPβCD. Этот результат косвенно подтверждает отсутствие взаимодействия циклодекстрина с HSA в рассматриваемых условиях.

Полученные результаты показали возможность использования Tucho NT.6, не только для тестирования белков, но и для систематического исследования взаимодействий белоксодержащих системах. Результаты представляют потенциальный ресурс для разработки технологий для фармацевтической индустрии.

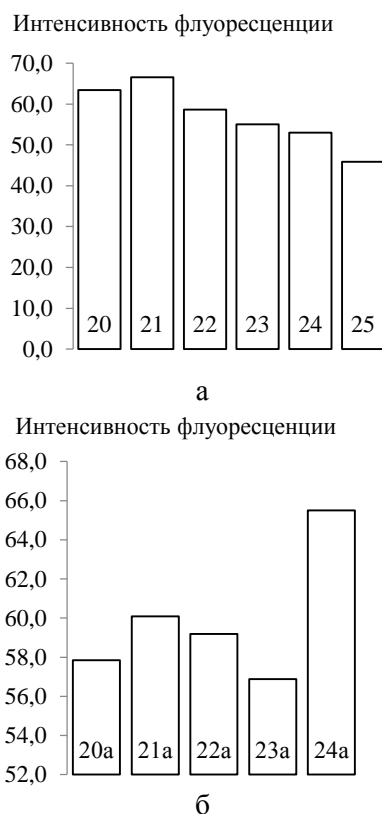


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции растворов HSA при различных концентрациях RU в отсутствие HPβCD (а) и в присутствии HPβCD (б) в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 3,4 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствуют приведенным в Табл. 3

Fig. 6. Sample brightness of HSA solutions at different concentrations of RU in the absence of HPβCD (a) and in the presence of HPβCD (b) in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 3.4 vol.% DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). The numbering of the samples and the concentration conditions of the solutions correspond to those given in Table 3

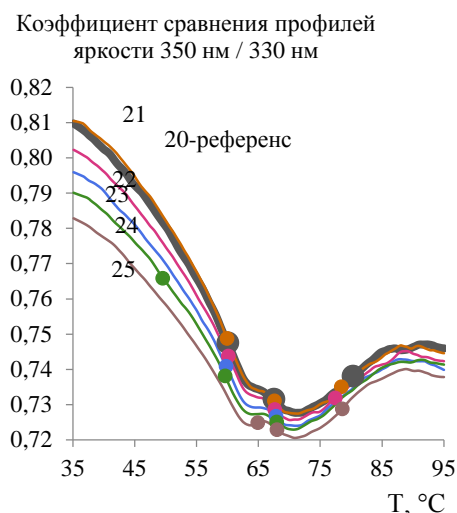


Рис. 7. Динамика соотношений внутренней флуоресценции триптофана и тирозина HSA при длинах волн 330/350 нм в зависимости от температуры и концентрации рутина в водно-диметилсульфоксидных растворах с содержанием 8 об.% ДМСО, pH=7,0 (фосфатный буфер). Нумерация образцов и концентрационные условия растворов соответствует нумерации, приведенной в Табл. 3

Fig. 7. Dynamics of the ratios of the internal fluorescence of tryptophan and tyrosine HSA at wavelengths of 330/350 nm depending on the temperature and concentration of rutin in aqueous dimethyl sulfoxide solutions containing 8 vol % DMSO, pH=7.0 (phosphate buffer). The numbering of the samples and the concentration conditions of the solutions correspond to the numbering given in Table 3

Работа выполнена в НИИ термодинамики и кинетики химических процессов Ивановского государственного химико-технологического университета в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (проект FZZW-2023-0008).

Анализ и обработка результатов исследований выполнены с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научной аппаратурой ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, № 075-15-2021-671).

Авторы выражают благодарность компании ООО «ТЕХНОИНФО» за предоставленное для проведения экспериментов оборудование Tycho NT.6.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The study was carried out in Research Institute of Thermodynamics and Kinetics of Chemical Processes of ISUCT in the frame of State task of Ministry of Science and Education (Project FZZW-2023-0008).

Analysis and processing of research results were carried out using the resources of the Center for Shared Use of Scientific Equipment of the ISUCT (with

the support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, N. 075-15-2021-671).

Authors thank the Company TEKHNOINFO for equipment Tycho NT.6 to carry out these experiments.

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Соловьева Н.Л., Сокурено М.С. // Разраб. и регистр. лекарств. средств. 2016. № 4 (17). С. 82-91.
Solovieva N.L., Sokurenko M.S. // Razrab. Registr. Lekarstv. Sredstv. 2016. N 4 (17). P. 82-91 (in Russian).
2. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушчино: Synchronbook. 2013. 310 с.
Tarahovskij Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine. Pushchino: Synchronbook. 2013. 310 p. (in Russian)
3. Mahran R.I., Hagra M.M., Sun D., Brenner D.E. Bringing curcumin to the clinic in cancer prevention: a review of strategies to enhance bioavailability and efficacy. *AAPS J.* 2017. V. 19. P. 54-81. DOI: 10.1208/s12248-016-0003-2.
4. Wongcharoen W., Jai-Aue S., Phrommintikul A., Nawarawong W., Woragidpoonpol S., Tepsuwan T., Sukonthasarn A., Apaijai N., Chattipakorn N. // *Am. J. Cardiol.* 2012. V. 110. N 1. P. 40-44. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.02.043.
5. Farooqui T., Farooqui A.A. Curcumin: Historical Background, Chemistry, Pharmacological Action, and Potential Therapeutic Value. *Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders.* 2019. P. 23-44. DOI: 10.1016/B978-0-12-815461-8.00002-5.
6. Bouchema K. // *Drug Discov. Today.* 2008. V. 13. N 21-22. P. 960-972. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.06.004.
7. Vasanti S., Parul G., Manikanta M. // *Biomed. Pharmacother.* 2017. V. 88. P. 1122-1144. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.157.
8. Zhou M., Zhang G., Hu J., Zhu Y., Lan H., Shen X., Lv Y., Huang L. // *Int. J. Biol. Sci.* 2021. V. 17. N 13. 3595-3607. DOI: 10.7150/ijbs.62471.
9. Кузнецова Е.Г., Рыжикова В.А., Саломатина Л.А., Севастьянов В.И. // *Вестн. трансплант. и искусств. органов.* 2016. Т. 18. № 2. С. 152-162.
Kuznetsova E.G., Ryzhikova V.A., Salomatina L.A., Sevastianov V.I. // *Vest. Transplant. Iskusstv. Organov.* 2016. V. 18. N 2. P. 152-162 (in Russian). DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-152-162.
10. Kelava T., Čavar I., Čulo F. // *Periodicum Biologorum.* 2011. V. 113. N 3. P. 311-320.
11. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна. 2002. 540 с.
Mashkovskiy M.D. Medicinal products. M.: Novaya volna. 2002. 540 p. (in Russian).
12. Hoang C., Nguyen A.K., Nguyen T.Q., Fang W., Han B., Hoang B.X., Tran H.D. // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2021. V. 37. N 8. P. 441-451. DOI: 10.1089/jop.2021.0043.

13. **Huang S.-H., Wu C.-H., Chen S.-J., Sytwu H.-K., Lin G.-J.** // *Immunobiology*. 2020. V. 225. N 3. 151906. DOI: 10.1016/j.imbio.2020.151906.
14. **Usacheva T., Gamov G., Bychkova A., Anufrikov Y., Shasherina A., Alister D., Kuranova N., Sharnin V.** // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2022. V. 147. N 9. P. 5511-5518. DOI: 10.1007/s10973-022-11216-8.
15. **Ni Y., Zhang X., Kokot S.** // *Acta A: Mol. Biomol. Spec.* 2009. V. 71. N 5. P. 1865-1872. DOI: 10.1016/j.saa.2008.07.004.
16. **Jagannathan R., Abraham P. M., Poddar P.** // *J. Phys. Chem. B*. 2012. V. 116. N 50. P. 14533-14540. DOI: 10.1021/jp3050516.
17. **Kar T., Basak P., Sen S., Ghosh R.K., Bhattacharyya M.** // *Front. Biol.* 2017. V. 12. P. 199-209. DOI: 10.1007/s11515-017-1449-z.
18. **Basu A., Kumar G.S.** // *J. Chem. Thermodyn.* 2014. V. 70. P. 176-181. DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.037.
19. **Hudson E.A., De Paula H.M.C., Ferreira G.M.D., Ferreira G.M.D., Do Carmo H.M., Da Silva L.H.M., Dos Pires S.A.C.** // *Food. Chem.* 2018. V. 242. P. 505-512. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.092.
20. **Hao C., Xu G., Wang T., Lv Z., Zhu K., Li B., Chen S., Sun R.** // *Russ. J. Phys. Chem. B*. 2017. V. 11. P. 140-145. DOI: 10.1134/S1990793117010043.
21. **Bourassa P., Kanakis C.D., Tarantilis P., Pollissiou M.G., Tajmir-Riahi H.A.** // *J. Phys. Chem. B*. 2010. V. 114. N 9. P. 3348-3354. DOI: 10.1021/jp9115996.
22. **Mohammadi F., Bordbar A., Divsalar A., Mohammadi K., Saboury A.A.** // *Protein J.* 2009. V. 28. N 3-4. P. 189-196. DOI: 10.1007/s10930-009-9184-1.
23. **Куранова Н.Н., Кабиров Д.Н., Кашина О.В., Фам Т.Л., Усачева Т.Р.** // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2020. Т. 63. Вып. 10. С. 23–29.
Kuranova N.N., Kabirov D.N., Kashina O.V., Pham Thi Lan, Usacheva T.R. // *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2020. V. 63. N 10. P. 23-29 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20206310.6285.
24. **Куранова Н.Н., Усачева Т.Р., Алистер Д.А., Кушнир Р.А.** // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2022. Т. 65. Вып. 10. С. 77-85. DOI: 10.6060/ivkkt.20226510.6697.
Kuranova N.N., Usacheva T.R., Alister D.A., Kushnir R.A. // *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 10. P. 77-85 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20226510.6697.

Поступила в редакцию 02.03.2023

Принята к опубликованию 14.04.2023

Received 02.03.2023

Accepted 14.04.2023