

А.І. ЛЕСЮК,<sup>1</sup> І.Ю. ДОРОШЕНКО,<sup>1</sup> О.П. ДМИТРЕНКО,<sup>1</sup> М.П. КУЛІШ,<sup>1</sup>  
Л.Л. ДАВТЯН,<sup>2</sup> А.О. ДРОЗДОВА,<sup>2</sup> М.І. КАНЮК<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

(Вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601; e-mail: lesyuk.andrey@gmail.com)

<sup>2</sup> Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика

(Вул. Дорогожичська, 9, Київ 04112)

<sup>3</sup> Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України

(Вул. Льва Левандовського (кол. Леонтовича), 9, Київ 01030)

## КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ІБУПРОФЕНУ З БИЧАЧИМ СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ: СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ

УДК 539

У даній роботі досліджено взаємодію ібупрофену з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) у водному середовищі з використанням експериментальних та комп'ютерних методів моделювання. Спектри гасіння флуоресценції отримано за сталої концентрації БСА (2 мкМ) та змінної концентрації ібупрофену (0–1,5 мкМ) для трьох значень температури (293, 303 і 313 К). Залежності інтенсивностей відповідають рівнянню Штерна–Фольмера та вказують на статичний механізм гасіння зі зростанням константи зв'язування з ростом температури, що свідчить про переважальний гідрофобний характер взаємодії. Отримані значення констант зв'язування становлять  $\lg K_s = 4,3\text{--}5,0$  при стехіометрії зв'язування, близькій до 1:1. Термодинамічний аналіз комплексоутворення показав  $\Delta G < 0$ ,  $\Delta H > 0$ ,  $\Delta S > 0$ , що підтверджує спонтанний та ентропійно зумовлений характер зв'язування. Молекулярне докінг-моделювання з БСА. Найбільш енергетично вигідні моди зв'язування молекули ібупрофену з БСА. Найбільш енергетично вигідні моди зв'язування містять ван-дер-ваальсівські, водневі, гідрофобні та електростатичні взаємодії, однак переважальними є контакти з гідрофобними залишками БСА. Розташування ібупрофену відносно триптофанових залишків відповідає експериментально спостережуваному гасінню флуоресценції.

**Ключові слова:** бичачий сироватковий альбумін, ібупрофен, гасіння флуоресценції, молекулярний докінг.

### 1. Вступ

У сучасній фармації білкові нанокон'югати, а також наночастинки, функціоналізовані білками, набувають особливої значущості як транспортні платформи для лікарських засобів, здатні підвищувати їх біодоступність, стабільність і таргетоване до-

ставляння [1–3]. Серед білкових компонентів, що використовуються як основа для створення нанотранспортних систем, на особливу увагу заслуговують сироваткові альбуміни – глобулярні, водорозчинні, які складаються з трьох доменів, кожен із двох піддоменами, з високою долею  $\alpha$ -спіралей ( $\approx 67\%$ ) [4]. БСА і ЛСА демонструють низьку імуногенність, високу біосумісність, тривалий період із напіврозпаду та здатність зв'язувати широкий спектр лігандів (ліпіди, гормони, лікарські сполуки) у своїх гідрофобних сайтах субдоменів ПА і ППА [5]. Сироватковий альбумін завдяки відносній доступності й високій спорідненості до лігандів, широко використовується як модельний білок у спектроскопічних (гасіння флуоресценції завдяки наявності триптофану в амінокислотній послі-

Цитування: Лесюк А.І., Дорошенко І.Ю., Дмитренко О.П., Куліш М.П., Давтян Л.Л., Дроздова А.О., Канюк М.І. Комплексоутворення ібупрофену з бичачим сироватковим альбуміном: спектроскопічне дослідження та молекулярне моделювання. *Укр. фіз. журн.* **70**, № 11, 789 (2025).

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2025. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

довності), калориметричних та біоінформатичних дослідженнях фармакокінетики й фармакодинаміки лікарських засобів [6] Зокрема, фізико-хімічні аспекти взаємодії БСА із широко використовуваними біоактивними сполуками [7–10], наночастинками металів [11–15] та їх оксидів [16–20] виявляють значущість білкових носіїв у контролі фармакокінетики та фармакодинаміки.

Серед лікарських препаратів широке застосування має ібупрофен – слабокислий, ліпофільний нестероїдний протизапальний препарат з високою спорідненістю з альбумінами плазми крові, що визначає його фармакокінетичні властивості [21–23]. Попередні дослідження взаємодії препарату з альбуміном обмежуються флуоресцентним гасінням [24, 25] або молекулярним моделюванням [26] окремо, але необхідний інтегрований підхід – поєднання спектроскопії та молекулярного докінгу. Мета цієї роботи – за допомогою комбінованого підходу флуоресцентної спектроскопії й молекулярного докінгу проаналізувати взаємодію ібупрофену з БСА, кількісно оцінити константи зв'язування, механізм взаємодії та молекулярні сайти комплексоутворення, що необхідно для прогнозування поведінки препарату *in vivo*. Вивчення взаємодії ібупрофену з БСА є актуальним для оцінки ефективності доставляння, біодоступності та потенційного системного впливу препарату. Методи охоплюють молекулярне моделювання та експериментальний метод гасіння флуоресценції водних розчинів БСА та ібупрофену.

## 2. Матеріали та методи дослідження

Для приготування зразків використовувався бичачий сироватковий альбумін (БСА) виробництва Sigma, США та ібупрофен (виробник Китай, постачальник ООО “Біолайн”), якість якого відповідає вимогам монографії Державної фармакопеї України [27]. Порошкоподібні речовини були розчинені у воді (рН = 5,5) з додаванням диметилсульфоксиду (ДМСО) до необхідного співвідношення в об'ємі 1,5 мл, що зумовлено поганою розчинністю ібупрофену у водних розчинах [21]. Відсоток ДМСО в розчинах пропорційний концентрації ібупрофену. Концентрація БСА залишалась сталою для всіх зразків ( $C_{\text{БСА}} = 2 \cdot 10^{-6}$  М), водночас концентрація ібупрофену була змінною ( $C_{\text{іб}} = 0, 2,5 \cdot 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 7,5 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 1,5 \cdot 10^{-6}$  М). Спектри флу-

оресценції водних розчинів БСА-ібупрофен знімалися за трьох різних температур  $T = 293$  К, 303 К, 313 К за допомогою стаціонарного спектрофлуорометра QuantaMaster 40 Intensity Based Spectrofluorometer, виробництва РТІ (HORIBA Scientific, Канада). Флуоресценція водного розчину БСА зумовлена наявністю у білковій молекулі БСА ароматичних амінокислот, насамперед триптофану, який виступає основним внутрішнім флуорофором. Під час збудження у діапазоні  $\sim 280$  нм триптофан випромінює з максимумом приблизно рівним 340 нм. За вказаного рівня рН БСА має позитивний заряд, що дає змогу уникнути агрегації макромолекул і спотворення спектра [28]. Концентрації речовин вибирались так, щоб співвідношення ліганд/білок залишалось релевантним для *in vivo* [28, 29].

Флуоресцентна спектроскопія є чутливим і інформативним методом для дослідження комплексоутворення білків з молекулами лікарських препаратів, оскільки дає змогу в режимі *in vitro* реєструвати зміни мікрооточення внутрішніх флуорофорів білкової макромолекули: амінокислотні залишки триптофану (Trp213 і Trp134 у БСА), тирозину або фенілаланіну. Взаємодія з лігандом (молекула препарату) може спричинити зміну інтенсивності флуоресценції, зсув максимуму емісії, зміну квантового виходу або часу життя збудженого стану, що є індикаторами утворення комплексу. Крім того, аналіз гасіння флуоресценції згідно з моделями динамічного та статичного гасіння (теорія Штерна–Вольмера) дає змогу визначити константи зв'язування, кількість центрів зв'язування та оцінити характер взаємодії (гідрофобний, електростатичний, водневий тощо). Метод характеризується високою чутливістю, дає змогу працювати з мікромольними концентраціями [30].

Комп'ютерне моделювання взаємодії молекули БСА та ібупрофену здійснене методом молекулярного докінгу, що дає змогу передбачити найімовірнішу просторову орієнтацію молекули ліганду (препарат) в активному центрі рецептора (білок), та оцінити енергію взаємодії в комплексі [31]. Суть методу полягає в систематичному або стохастичному пошуку положень ліганду відносно рецептора з подальшою оцінкою стабільності комплексу за допомогою скоринг-функції. Молекулярний докінг проводився за допомогою програми AutoDock 4,

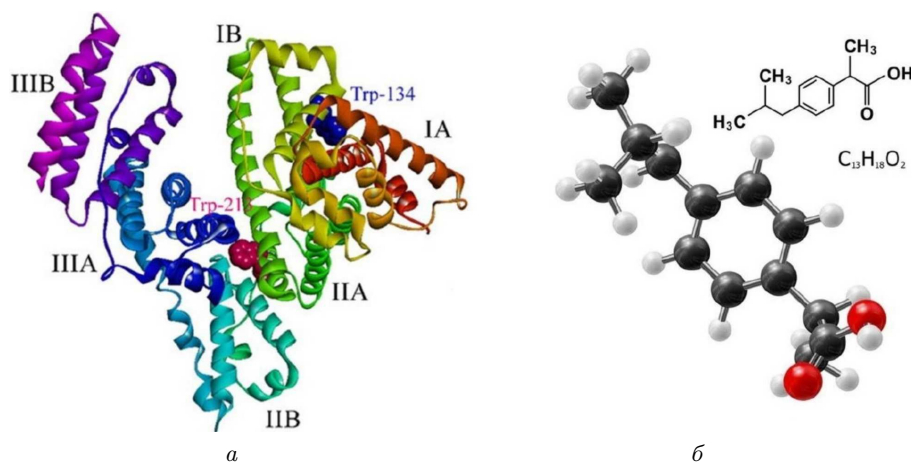


Рис. 1. Молекули БСА (а) та ібупрофену (б)

яка реалізує генетичний алгоритм для генерації конформацій та розраховує напівемпіричну вільну енергію зв'язування (скоринг-функцію) у такому вигляді:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{desolv}} + \Delta G_{\text{tors}}, \quad (1)$$

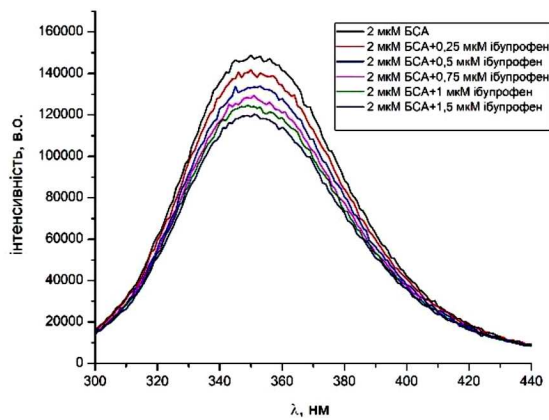
де  $\Delta G_{\text{bind}}$  – енергія зв'язування як різниця між вільною енергією комплексу та енергіями молекул окремо, а доданки в правій частині рівності відповідають внескам, відповідно, від ван-дер-ваальсівської взаємодії, електростатичної взаємодії, водневих зв'язків, впливу розчинника та ентропійної складової, що описує втрату обертальних ступенів вільності ліганду в умовах зв'язування з рецептором. В процесі пошуку конформацій молекулярного комплексу моди зв'язування ранжуються за значеннями енергії зв'язування. Структура молекули БСА (рис. 1) була отримана з кристалографічної бази даних RCSB Protein Data Bank (код 4F5S) [32], координати молекули ібупрофену взято з PubChem (CID: 3672) [33].

### 3. Спектроскопічне дослідження флуоресценції

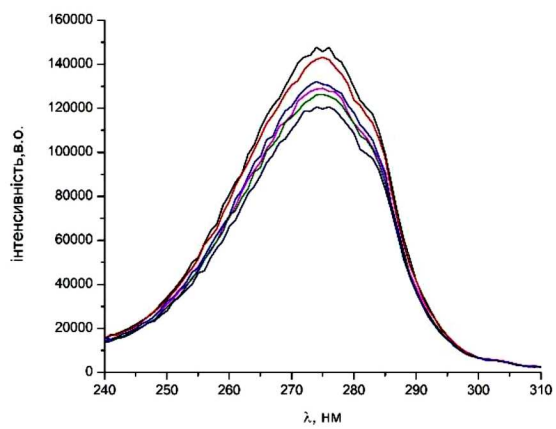
На рис. 2 наведено зареєстровані спектри флуоресценції водних розчинів БСА (за фіксованої концентрації 2 мкМ) та ібупрофену (за змінної концентрації) за різних температур 293 К (20 °С), 303 К (30 °С) та 313 К (40 °С). Такі значення ви-

брано для дослідження взаємодії БСА з ібупрофеном, оскільки є фізіологічно релевантними для умов *in vivo* та, водночас, залишаються нижчими за температуру денатурації БСА (~60 °С) [34]. Декілька температур необхідно для подальшого аналізу температурної залежності зв'язування молекул через термодинамічні параметри взаємодії, щоб з'ясувати природу домінуючих сил у процесі комплексоутворення [35]. Зі збільшенням концентрації препарату спостерігається монотонне зниження інтенсивності флуоресценції БСА (гасіння флуоресценції) за всіх температур. Це може бути зумовлено кількома фізико-хімічними механізмами [30]. По-перше, можливим є динамічний механізм, зумовлений зіткненнями флуорофора (триптофановий залишок) з лігандом, що приводить до безвипромінювальної релаксації флуорофора зі збудженого в основний стан. Також можливим є статичний механізм, що полягає в утворенні стабільного нефлуоресцентного комплексу між молекулою білка та лігандом, коли флуорофор не переходить у збуджений стан. Також зменшення інтенсивності може бути наслідком резонансного переносу енергії (FRET), якщо ліганд (акцептор) розташовується на незначній відстані (не більше ніж 6 нм) та отримує енергію від флуорофора (донор) завдяки диполь-дипольній взаємодії. Крім того, конформаційні зміни білка поблизу флуорофора можуть змінити його мікрооточення і, відповідно, квантовий вихід флуоресценції. Перенесення заряду або внутрішньомолекулярні релаксаційні процеси також можуть відігравати роль у зни-

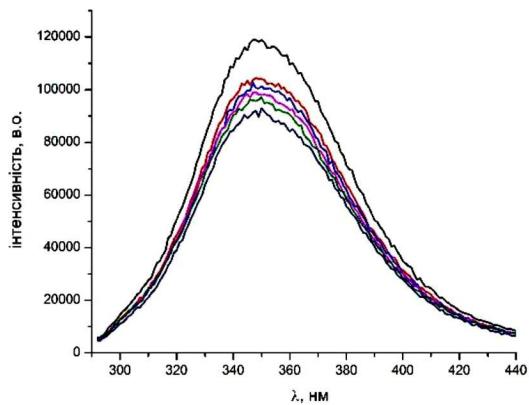
$T = 293 \text{ K}$



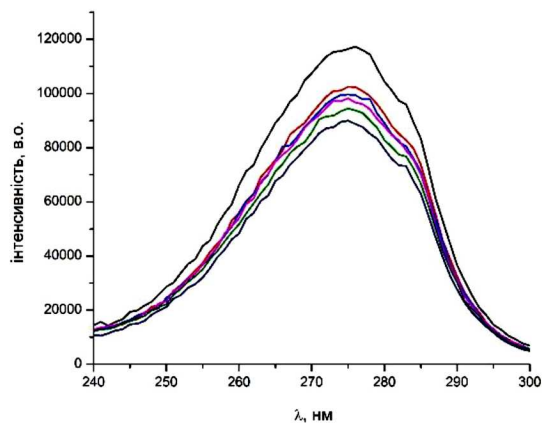
$T = 293 \text{ K}$



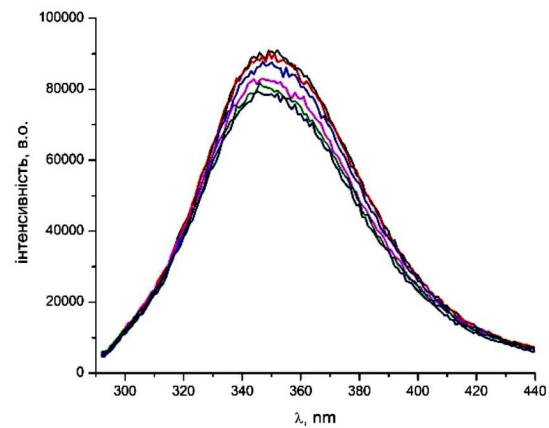
$T = 303 \text{ K}$



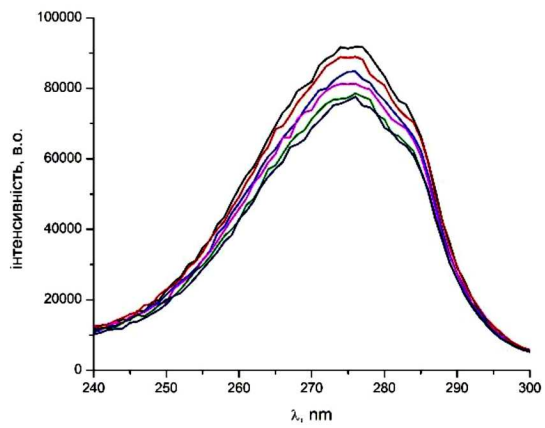
$T = 303 \text{ K}$



$T = 313 \text{ K}$



$T = 313 \text{ K}$



*a*

*б*

Рис. 2. Спектри емісії ( $\lambda_{ex} = 353 \text{ нм}$ ) (а) та збудження ( $\lambda_{em} = 275 \text{ нм}$ ) флуоресценції водних розчинів БСА та ібупрофену за трьох різних температур (б)

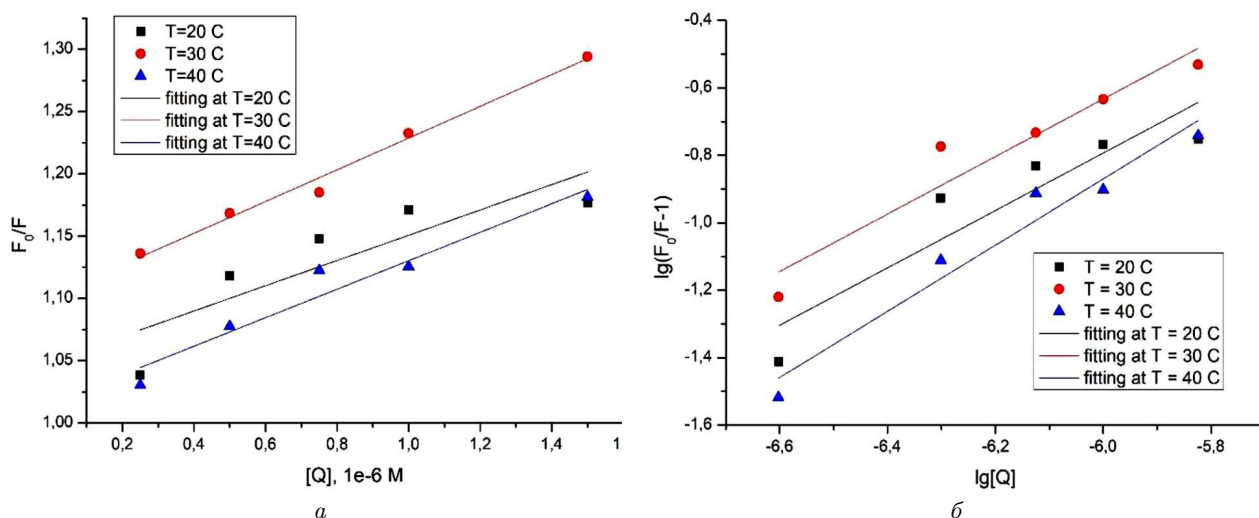


Рис. 3. Залежності Штерна–Фольмера (а) та Хілла (б) для опису динамічного та статичного механізмів гасіння флуоресценції

женні інтенсивності. Нарешті, важливим фактором є перепоглинання збуджувального або емісійного світла лігандом (inner filter effect), коли високої концентрації препарату призводять до часткового поглинання світла [36]. Оскільки дослідження проводилися за низьких концентрацій ібупрофену ( $\leq 1,5 \cdot 10^6$  M), при яких оптична густина розчинів залишалася нижчою за поріг внутрішнього фільтраційного ефекту, вплив цього ефекту на результати флуоресцентного аналізу можна вважати незначним [36]. Крім того, відсутність зміщення максимумів емісійних спектрів свідчить про стабільність мікрооточення триптофанового залишку, що вказує на відсутність істотних конформаційних змін у структурі білка в умовах зв'язування з лігандом [37]. Таким чином, спостережуване гасіння флуоресценції зумовлене переважно специфічними механізмами білок-лігандної взаємодії – динамічним гасінням, статичним комплексоутворенням або потенційним енергетичним перенесенням (FRET), якщо відстані до флуорофора є достатньо малими.

Динамічне гасіння розглядається як результат контакту молекул флуорофора і гасника при їх зіткненні в результаті дифузійного руху протягом життя у збудженому стані донора енергії. Цей процес гасіння описується рівнянням Штерна–Фольмера [30]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_q [Q], \quad (2)$$

де  $F_0$  і  $F$  – величини інтенсивності ФЛ в розчинах БСА за браком та за наявності гасника. В теорії Штерна–Фольмера припускається, що  $F_0/F$  лінійно залежить від концентрації гасника  $[Q]$  з параметрами  $K_{SV}$  – константи гасіння Штерна–Фольмера,  $k_q$  – константи швидкості біомолекулярного гасіння (є сталими величинами в умовах динамічного гасіння). Ці константи пов'язані між собою співвідношенням  $K_{SV} = k_q \cdot \tau_0$ , де  $\tau_0$  – час життя флуорофора у збудженому стані ( $\tau_0 = 10^{-8}$  с). В результаті лінійної апроксимації експериментальних даних (рис. 3, а) одержані параметри гасіння  $k_q$  (див. табл. 1) перевищують допустиме максимальне значення  $2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  для процесу взаємної дифузії молекул БСА та ібупрофену [30], а тому реалізується інший механізм гасіння – статичний.

Статичний механізм пов'язаний з утворенням стійких молекулярних комплексів протеїнів з ліка-

Таблиця 1. Величини констант гасіння  $K_{SV}$  і  $k_q$  для розчинів БСА-ібупрофен за різних температур

T, K	Параметр гасіння	
	$k_q, \times 10^{14}, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$K_{SV}, \times 10^6, \text{ M}^{-1}$
293	$0,1 \pm 0,033$	$0,1 \pm 0,033$
303	$0,13 \pm 0,008$	$0,13 \pm 0,008$
313	$0,11 \pm 0,016$	$0,11 \pm 0,016$

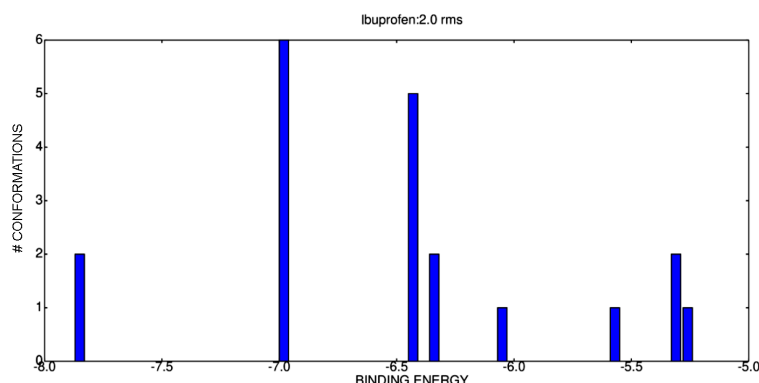


Рис. 4. Кластеризація мод зв'язування БСА з ібупрофеном (енергія вказана в ккал/моль)

ми в основному стані з незбуджуваними флуорофорами. Для цього механізму аналіз гасіння флуоресценції проводиться з використанням рівняння Хілла [30]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q], \quad (3)$$

де  $K_A$  – константа зв'язування біомолекулярного комплексу,  $n$  – число місць зв'язування ліганда та білка. Наведене рівняння є лінійною залежністю гасіння від концентрації гасника (в логарифмічно-

Таблиця 2. Константи зв'язування  $K_A$  та число місць зв'язування  $n$  для розчинів БСА-ібупрофен за різних температур

T, K	Параметр зв'язування	
	$\lg K_A$	$n$
293	$4,3 \pm 1,2$	$0,85 \pm 0,2$
303	$4,5 \pm 0,87$	$0,9 \pm 0,14$
313	$5 \pm 0,75$	$1 \pm 0,11$

Таблиця 3. Термодинамічні параметри розчинів БСА-ібупрофен

T, K	Термодинамічний параметр		
	$\Delta G \cdot 10^3$ , Дж/моль	$\Delta S$ , Дж · моль <sup>-1</sup> · К <sup>-1</sup>	$\Delta H \cdot 10^3$ , Дж/моль
293	$-24,1 \pm 6,7$	$290 \pm 79$	$61,1 \pm 16,4$
303	$-26,1 \pm 5$	$287 \pm 71$	
313	$-30 \pm 4,5$	$291 \pm 68$	

му масштабі). Нахил цієї прямої (рис. 3, б) дає змогу визначити параметри зв'язування  $n$  та  $K_A$ .

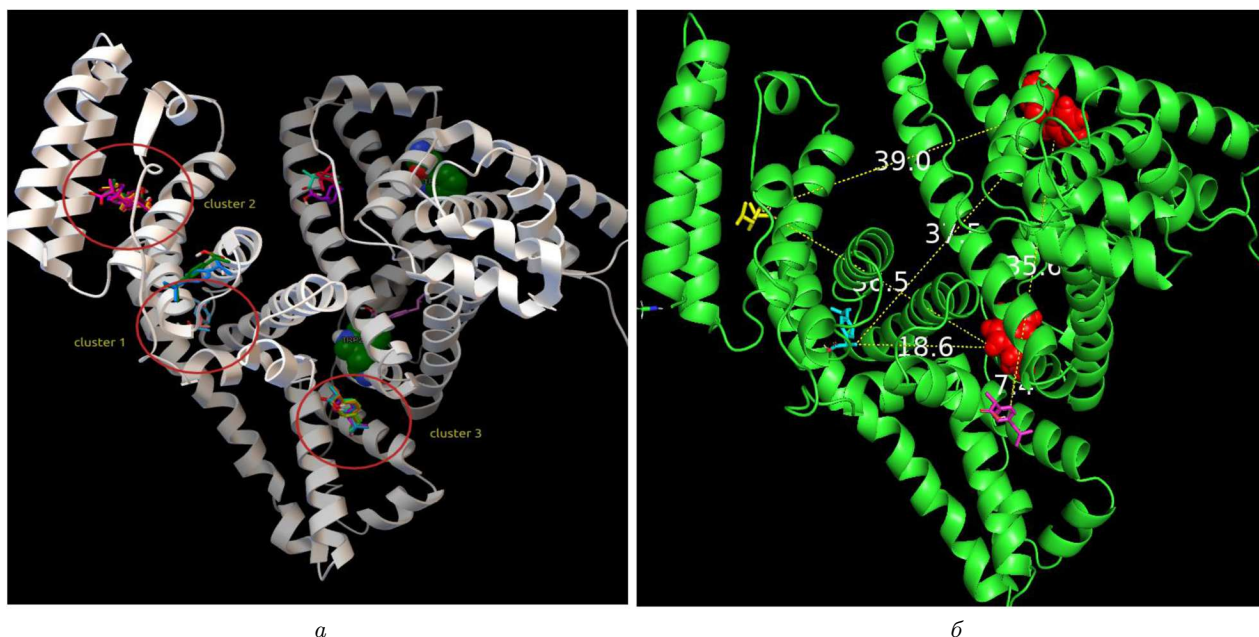
Отримані значення (див. табл. 2) демонструють посилення взаємодії зі зростанням температури, що характерно для гідрофобного характеру комплексоутворення між молекулами ібупрофену та БСА [38], коли зв'язування супроводжується видаленням води з гідрофобних кишень білка та експонуванням гідрофобних амінокислотних залишків (ентропійний ефект). Самі значення свідчать про помірно сильне зв'язування у комплексах, де до однієї молекули БСА приєднується одна молекула ібупрофену. Визначені константи зв'язування за різних температур  $T$  дають змогу за рівняннями ван Гоффа обчислити зміни термодинамічних параметрів у процесі утворення комплексів:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_A, \quad (4)$$

де  $\Delta G$  – вільна енергія Гіббса,  $\Delta H$  – ентальпія,  $\Delta S$  – ентропія,  $R = 8,314$  Дж · моль<sup>-1</sup> · К<sup>-1</sup>. Отримані в результаті підстановки параметрів зв'язування в (4) термодинамічні характеристики наведені у табл. 3. Від'ємне значення енергії зв'язування свідчить про спонтанний характер взаємодії та наявність електростатичної взаємодії. Додатні значення ентропії та ентальпії підтверджують переважальний гідрофобний характер комплексоутворення.

#### 4. Молекулярний докінг

Моделювання молекулярного докінгу виконувалось у програмному пакеті AutoDock 4.2.6 з напівемпіричною скоринг-функцією та генетичним ал-



**Рис. 5.** Кластери мод зв'язування (а) та найоптимальніші моди кожного з них із вказаними відстанями в ангстремах до двох флуоресцентних триптофанових амінокислотних залишків (б)

горитмом Ламаркіана для пошуку найбільш енергетично вигідної конфігурації комплексу БСА-ібупрофен. У процесі моделювання структура протеїнової макромолекули була жорстко зафіксованою (жорсткий докінг), молекула ліганду (ібупрофен) вважалась гнучкою завдяки наявності 5 ротційних ступенів вільності (рис. 1). В результаті моделювання визначено 20 мод (див. рис. 5, а) молекулярних комплексів, що групуються за близьким розташуванням та значенням енергії зв'язування в декілька кластерів (рис. 4). Найчисленніші та енергетично вигідні кластери виділено на рис. 5, а. Лише один кластер містить конформації ліганду в безпосередній близькості до триптофанового амінокислотного залишку Trp213 в субдомени ПА. Інші кластери містяться в субдомени ПІА і віддалені від триптофанових залишків. Розташування кластерів відносно молекули БСА та триптофанових амінокислотних залишків приведено на рис. 5, б. Відстані до залишків від найоптимальніших мод кожного з трьох кластерів наведено у табл. 4. Середні відстані до триптофанових залишків для кожної з мод є помітними порівняно з характерним розміром молекули БСА, тому гасіння флуоресценції не буде значним (що, власне, спостерігається в ек-

перименті на рис. 1), однак можливим, оскільки значення є меншими за граничне значення (6 нм), що уможливило реалізацію Фьорстерівського механізму безвипромінювальної передачі енергії від донора (триптофан) до акцептора (ібупрофен).

Визначена з докінгу енергія зв'язування молекул у комплексі з трьох кластерів відповідає значенням, отриманих зі спектральних даних гасіння флуоресценції. Значне від'ємне значення  $\Delta G$  свідчить про формування стійких комплексів, а тому підтверджує статичний механізм гасіння за участі FRET. Енергія взаємодії молекул у комплексах складається із внесків від ван-дер-ваальсівської та гідрофобної взаємодій, водневих зв'язків, електростатичних сил (див. табл. 5). Перші два кластери охоплюють 8 мод з 20, для яких характерною є

**Таблиця 4.** Відстані від молекул ібупрофену до триптофанових залишків в ангстремах

Триптофановий залишок	Мода 1 (кластер 1)	Мода 3 (кластер 2)	Мода 9 (кластер 3)
Trp134	37,5	35,6	39
Trp213	18,6	7,4	36,5

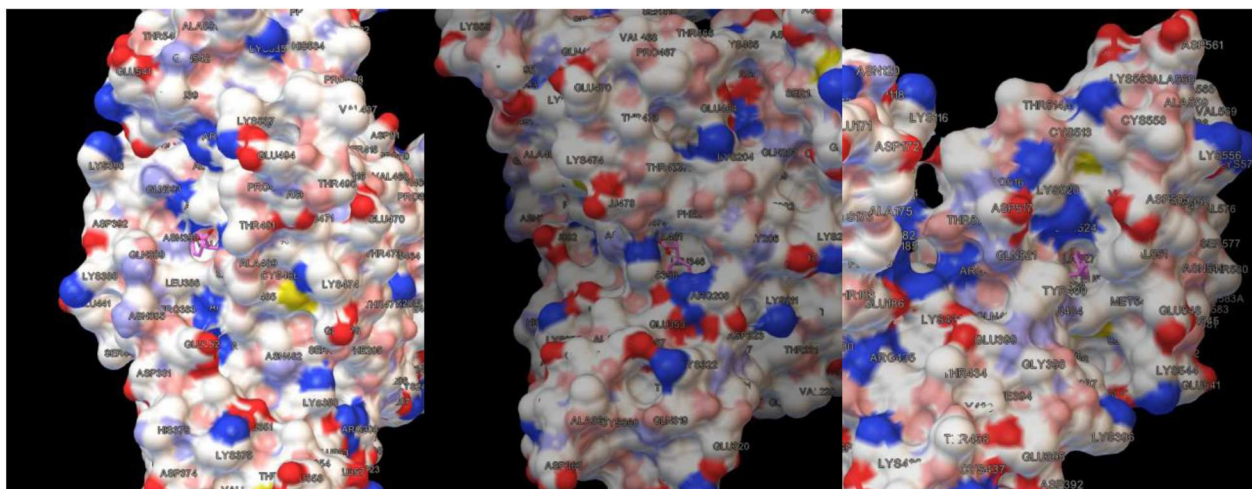


Рис. 6. Сайти зв'язування молекули ібупрофену у найоптимальніших модах трьох кластерів докінг-моделювання з молекулою БСА (червоним, синім та жовтим позначено, відповідно, негативно, позитивно заряджені та гідрофобні амінокислотні залишки)

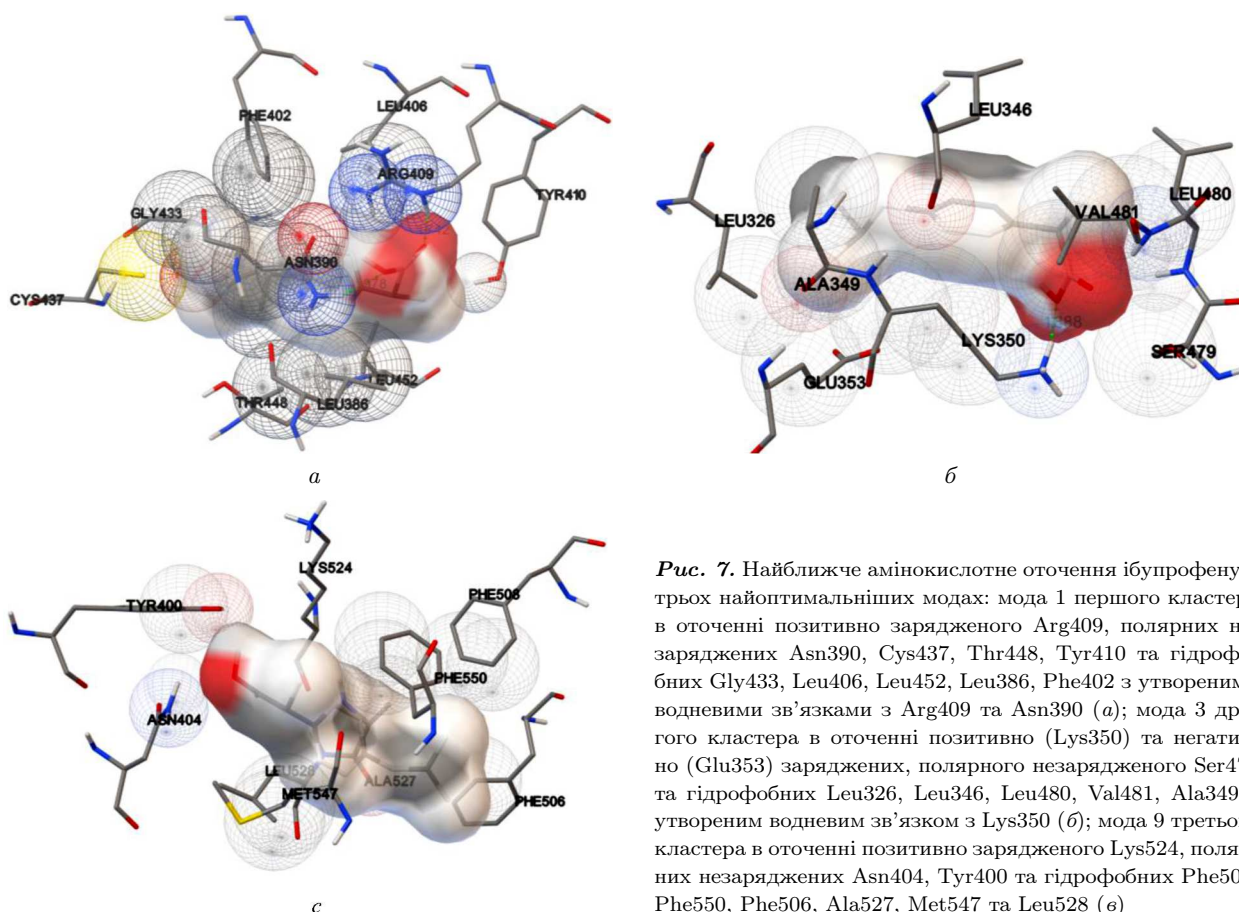


Рис. 7. Найближче амінокислотне оточення ібупрофену у трьох найоптимальніших модах: мода 1 першого кластера в оточенні позитивно зарядженого Arg409, полярних незаряджених Asn390, Cys437, Thr448, Tyr410 та гідрофобних Gly433, Leu406, Leu452, Leu386, Phe402 з утвореними водневими зв'язками з Arg409 та Asn390 (а); мода 3 другого кластера в оточенні позитивно (Lys350) та негативно (Glu353) заряджених, полярного незарядженого Ser479 та гідрофобних Leu326, Leu346, Leu480, Val481, Ala349 з утвореним водневим зв'язком з Lys350 (б); мода 9 третього кластера в оточенні позитивно зарядженого Lys524, полярних незаряджених Asn404, Tyr400 та гідрофобних Phe508, Phe550, Phe506, Ala527, Met547 та Leu528 (в)



Таблиця 5. Енергії взаємодії молекул у найоптимальніших кластерах

Кластер №	Мода №	VdW/hb/ десольватація, ккал/моль	Електростат., ккал/моль	Торсійний, ккал/моль	Енергія зв'язку, ккал/моль
1	1	-8,0	-1,34	1,49	-7,85
	2	-7,37	-1,29	1,49	-7,16
2	3	-6,75	-1,71	1,49	-6,98
	4	-6,74	-1,72	1,49	-6,96
	5	-6,72	-1,73	1,49	-6,96
	6	-6,46	-1,93	1,49	-6,9
	7	-6,57	-1,74	1,49	-6,82
	8	-6,52	-1,68	1,49	-6,71
3	9	-7,84	-0,08	1,49	-6,43
	10	-7,8	-0,07	1,49	-6,38
	11	-7,87	-0,16	1,49	-6,38
	12	-7,7	-0,15	1,49	-6,36
	13	-7,57	-0,1	1,49	-6,18

значна електростатична компонента, тому їх реалізація більш імовірна через далекодію електростатичних сил. Сильніше електростатична взаємодія проявляється для 2-го кластера, тоді як ван-дер-ваальсівські сили, водневі зв'язки та гідрофобний ефект більш інтенсивні для 1-го кластера. Переважна роль того чи іншого типу взаємодії визначатиметься типом амінокислотних залишків (гідрофобні, заряджені та полярні незаряджені) найближчого оточення молекули ібупрофену у сайті зв'язування.

На рис. 6 приведено сайти зв'язування молекул ібупрофену (головні моди кластерів) з молекулою БСА. Видно, що моди 1-го та 2-го кластерів оточені зарядженими амінокислотними залишками, що уможливило існування стійкого молекулярного комплексу. Мода 3-го кластера міститься в гідрофобній кишені біля Trp213.

Найближче амінокислотне оточення (до 6 Å) з утвореними водневими зв'язками наведено на рис. 7. Відповідно до типу найближчих амінокислотних залишків можемо зробити висновок про переважний гідрофобний характер взаємодії ібупрофену з БСА у сайті зв'язування. Однак, значимо, що в всіх модах зв'язування проявляються різні типи комплексотворних сил. Зокрема, ван-дер-ваальсівська взаємодія з полярними залишками найбільше проявляється в моді 1, водневі зв'язки – в модах 1 та 3, гідрофобна – в

модах 3 та 9. Електростатичні сили проявляються, як і було сказано вище, в модах 1 та 3 під час взаємодії із зарядженими амінокислотними залишками.

## 5. Висновки

У цьому дослідженні продемонстровано, що ібупрофен утворює стабільні комплекси з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) в умовах водного середовища, що підтверджується результатами флуоресцентної спектроскопії та молекулярного докінгу. Спектроскопічні дослідження вказують на переважно статичний механізм гасіння флуоресценції з константами гасіння, які перевищують дифузійний поріг, та на енергетично сприятливе та помірно сильне ( $\Delta G = -24 - -28$  кДж/моль), але оборотне, зв'язування молекул БСА та ібупрофену у комплексах. Стехіометричне співвідношення близьке до 1:1 є типовим для специфічної, насичуваної взаємодії, демонструє здатність ібупрофену до лігандної конкуренції в процесі зв'язування з альбуміном. З іншого боку, такі комплекси відносно легко дисоціюють, що важливо для контрольованого вивільнення препарату. Зростання температури супроводжується збільшенням констант зв'язування та позитивними значеннями ентальпії і ентропії, що свідчить про переважно гідрофобну природу взаємодії.

Молекулярне моделювання підтвердило наявність кількох енергетично сприятливих сайтів зв'язування ібупрофену на поверхні БСА, головним чином у субдоменах ІІА та ІІІА. В процесі зв'язування реалізуються різні види взаємодій з амінокислотним оточенням: ван-дер-ваальсівські, гідрофобні, водневі та електростатичні, однак з переважними зв'язками з гідрофобними амінокислотними залишками. Це свідчить про високу біодоступність препарату, стійкість комплексів у плазмі крові, здатність препарату накопичуватися в гідрофобних середовищах (мембранах, ліпідних матриксах). Локалізація молекули ібупрофену відносно триптофанових амінокислотних залишків Trp213 та Trp134 узгоджується зі статичним механізмом гасіння флуоресценції та уможлиблює нерадіаційне резонансне перенесення енергії (FRET) з переходом комплексу в незбуджений стан без випромінювання.

*Робота була виконана за підтримки Національного фонду досліджень України в рамках проекту “Наноструктурна модифікація аплікаційних лікарських засобів для військово-медичних технологій” (грант № 2023.04/0140).*

1. F. Simonelli, G. Rossi, L. Monticelli. Role of ligand conformation on nanoparticle–protein interactions. *J. Phys. Chem. B* **123**, 1764 (2019).
2. A.L. Martínez-López, C. Pangua, C. Reboredo, R. Campión, J. Morales-Gracia, J.M. Irache. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int. J. Pharm.* **581**, 119289 (2020).
3. T. Pho, J.A. Champion. Surface engineering of protein nanoparticles modulates transport, adsorption, and uptake in mucus. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **14**, 51697 (2022).
4. A. Bujacz. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1278 (2012).
5. A. Michnik, K. Michalik, A. Kluczevska, Z. Drzazga. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *J. Therm. Anal. Calorim.* **84**, 113 (2006).
6. X. Xu, J. Hu, H. Xue, Y. Hu, Y. Liu, G. Lin, L. Liu, R. Xu. Applications of human and bovine serum albumins in biomedical engineering: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **253**, 126914 (2023).
7. E. Karami, M. Behdani, F. Kazemi-Lomedasht. Albumin nanoparticles as nanocarriers for drug delivery: Focusing on antibody and nanobody delivery and albumin-based drugs. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **55**, 101471 (2020).
8. O. Holovko, O. Dmytrenko, M. Kulish, A. Lesiuk, O. Pavlenko, A. Naumenko, M. Kaniuk, I. Doroshenko. Mecha-

- nisms of heteroassociation in aqueous solutions of BSA with curcumin. *J. Mol. Liq.* **415**, 126364 (2024).
9. O.O. Holovko, O.P. Dmytrenko, A.I. Lesiuk, M.P. Kulish *et al.* Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **768**, 29 (2024).
  10. O. Dmytrenko, M. Kulish, O. Pavlenko, A. Lesiuk, A. Momot, T. Busko, M. Kaniuk, T. Nikolaienko, L. Bulavin. Mechanisms of heteroassociation of ceftriaxone and doxorubicin drugs with bovine serum albumin. In: *Soft Matter Systems for Biomedical Applications* (Springer, 2022).
  11. N.A. Goncharenko, O.P. Dmytrenko, O.L. Pavlenko, M.P. Kulish, I.P. Pundyk, A.I. Lesyuk, T.O. Busko *et al.* Complexation peculiarities in “Doxorubicin–Bovine Serum Albumin–Gold Nanoparticles” heterosystem. *Ukr. Fiz. Zh.* **65**, 464 (2020).
  12. R. Jin, D. Song, H. Xiong, L. Ai, P. Ma, Y. Sun. Magnetic core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanoparticles for studies of quinolones binding to protein by fluorescence spectroscopy. *Luminescence* **31**, 499 (2016).
  13. S. Kaumbekova, N. Sakaguchi, D. Shah, M. Umezawa. Effect of gold nanoparticles on the conformation of bovine serum albumin: insights from CD spectroscopic analysis and molecular dynamics simulations. *ACS Omega* **9**, 49283 (2024).
  14. A. Spada, J. Emami, J.A. Tuszyński, A. Lavasanifar. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. *Mol. Pharm.* **18**, 1862 (2021).
  15. N. Qu, K. Song, Y. Ji, M. Liu, L. Chen, R.J. Lee, L. Teng. Albumin nanoparticle-based drug delivery systems. *Int. J. Nanomed.* **2024**, 6945 (2024).
  16. M. Bukackova, R.J.B.C. Marsalek. Interaction of BSA with ZnO, TiO<sub>2</sub>, and CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biophys. Chem.* **267**, 106475 (2020).
  17. R. Thiramanas, Y. Wongngam, G. Supanakorn, D. Polpanich. BSA adsorption on titanium dioxide nanoparticle surfaces for controlling their cellular uptake in skin cells. *ACS Appl. Bio Mater.* **7**, 1713 (2024).
  18. M. Lokolkar, A. Udnoor, M.S. Ali, U. Katrahalli, M.N. Kalasad, H.A. Al-Lohedan, M.D. Hadagali. Investigations on the complexation and binding mechanism of bovine serum albumin with Ag-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **26**, 26453 (2024).
  19. 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. Binding parameters and conjugation mechanisms in the solutions of BSA with antioxidant CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **750**, 144 (2023).
  20. P.P. Gorbyk, A.L. Petranovska, O.P. Dmytrenko, O.L. Pavlenko, I.P. Pundyk, T.O. Busko, T.M. Pinchuk-Rugal *et al.* Adsorption mechanisms of gemcitabine molecules on the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with biocompatible coatings. In: *Nanooptics and Photonics, Nanochemistry and Nanobiotechnology, and Their Applications: Selected Proceedings of the 7th International Conference*

- Nanotechnology and Nanomaterials (NANO2019)*, 27–30 August 2019, Lviv, Ukraine (Springer, 2020), p. 195.
21. J. Irvine, A. Afrose, N. Islam. Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **44**, 173 (2018).
  22. X. Yuan, A.C. Capomacchia. Influence of physicochemical properties on the in vitro skin permeation of the enantiomers, racemate, and eutectics of ibuprofen for enhanced transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **102**, 1957 (2013).
  23. I. Doroshenko, T. Rudenok, A. Lesiuk, A. Smal, O. Dmytrenko, L. Davtian, A. Drozdova. Peculiarities of ibuprofen interaction with polyethylene glycol polymer matrix. *Low Temp. Phys.* **51**, 215 (2025).
  24. Y. Ni, R. Zhu, S. Kokot. Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. *Analyst* **136**, 4794 (2011).
  25. A. Ploch-Jankowska, D. Pentak. A comprehensive spectroscopic analysis of the ibuprofen binding with human serum albumin, part I. *Pharmaceuticals* **13**, 205 (2020).
  26. S. Evoli, D.L. Mobley, R. Guzzi, B. Rizzuti. Multiple binding modes of ibuprofen in human serum albumin identified by absolute binding free energy calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 32358 (2016).
  27. Державна Фармакопея України/Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. 1-е вид. (PIPEG, 2001) [ISBN: 966-95824-3-1].
  28. T. Peters. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (Academic Press, 1995) [ISBN: 0-12-552110-3].
  29. N.M. Davies. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen: The first 30 years. *Clinic. Pharmacokinet.* **34**, 101 (1998).
  30. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Edited by J.R. Lakowicz (Springer, 2006) [ISBN: 978-0-387-31278-1].
  31. G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785 (2009).
  32. A. Bujacz. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. D* **68**, 1278 (2012).
  33. *National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen.* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>.
  34. O. Matsarskaia, L. Bühl, C. Beck, M. Grimaldo, R. Schweins, F. Zhang, T. Seydel, F. Schreiber, F. Roosen-Runge. Evolution of the structure and dynamics of bovine serum albumin induced by thermal denaturation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 18507 (2020).
  35. S.G. Krimmer, G. Klebe. Thermodynamics of protein–ligand interactions as a reference for computational analysis: how to assess accuracy, reliability and relevance of experimental data. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **29**, 867 (2015).
  36. T. Weitner, T. Friganovic, D. Šakić. Inner filter effect correction for fluorescence measurements in microplates using variable vertical axis focus. *Anal. Chem.* **94**, 7107 (2022).
  37. J.T. Vivian, P.R. Callis. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093 (2001).
  38. A.R. Alhankawi, J.K. Al-Husseini, A. Spindler, C. Baker, T.T. Shoniwa, M. Ahmed, P.A. Chiarelli, M.S. Johal. The relationship between hydrophobicity and drug–protein binding in human serum albumin: a quartz crystal microbalance study. *Biophysica* **2**, 113 (2022).

Одержано 18.07.25

A.I. Lesiuk, I.Yu. Doroshenko,  
O.P. Dmytrenko, M.P. Kulish, L.L. Davtyan,  
A.O. Drozdova, M.I. Kanyuk

COMPLEXATION OF IBUPROFEN  
WITH BOVINE SERUM ALBUMIN:  
SPECTROSCOPIC STUDY  
AND MOLECULAR SIMULATION

The interaction of ibuprofen with bovine serum albumin (BSA) in the aqueous environment has been studied using both experimental and computer simulation methods. The fluorescence quenching spectra are obtained at a constant BSA concentration of 2  $\mu\text{M}$ , varying ibuprofen concentrations of 0–1.5  $\mu\text{M}$ , and three fixed temperatures of 293, 303, and 313 K. The intensity dependences follow the Stern–Volmer equation and testify to the static quenching mechanism. Together with the temperature-induced growth of the binding constant, this result points to the predominantly hydrophobic nature of the interaction. The obtained binding constants equal  $\lg K_s = 4.3 \div 5.0$  at the binding stoichiometry close to 1 : 1. The thermodynamic analysis of the complexation showed that  $\Delta G < 0$ ,  $\Delta H > 0$ , and  $\Delta S > 0$ ,  $G$ ,  $H$ ,  $S$  which confirms the spontaneous and entropy-driven character of the binding process. Molecular docking simulation using AutoDock 4.2.6 made it possible to identify three main binding sites of ibuprofen with BSA. The most energetically favorable binding modes include van der Waals, hydrogen bonding, hydrophobic, and electrostatic interactions; nevertheless, contacts with hydrophobic residues of BSA prevail. The calculated spatial arrangement of ibuprofen with respect to tryptophan residues corresponds to the experimentally observed fluorescence quenching.

*Keywords:* bovine serum albumin, ibuprofen, fluorescence quenching, molecular docking.