



## Investigation of the interaction between irinotecan (derived from camptothecin plant alkaloid) with human serum albumin by spectroscopic techniques and computational study

Noushin Bijari<sup>1</sup>, Sirous Ghobadi<sup>2\*</sup>, Katayoun Derakhshandeh<sup>3\*</sup>

1. PhD Student of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article history

Submitted: 2022-6-15  
Revised: 2022-6-28  
Accepted: 2022-8-12

### KEYWORDS

Alkaloid,  
Fluorescence  
quenching;  
Fluorescence  
resonance energy  
transfer; Human  
serum albumin;  
Irinotecan

Irinotecan is considered to be one of the most effective anticancer drugs for colorectal cancer therapy. In this study, the role of human serum albumin (HSA), as a protein biopolymer and safe drug delivery system, in the binding of irinotecan was surveyed. The interaction between irinotecan and HSA has been studied by fluorimetry, circular dichroism (CD) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as well as molecular docking study. By the analysis of the fluorescence spectra, it was observed that irinotecan can quench the intrinsic fluorescence of HSA through a static quenching procedure. The binding parameters were determined according to the modified Stern-Volmer equation and the enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) and entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) of binding were calculated to be  $-19.11 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $13.80 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , respectively. The Analysis of the thermodynamic parameters indicated that the hydrogen bonding and hydrophobic interactions played the dominant role in the stabilization of the irinotecan-HSA complex. The competitive site markers experiments indicated that the drug binds to the site I of HSA, confirmed by molecular docking. The distance,  $r$ , between the donor (HSA) and the acceptor (irinotecan) was obtained according to Förster's theory of non-radiation energy transfer. The quantitative analysis of the far-UV CD and FT-IR spectra represented that irinotecan has induced some alterations in the secondary and tertiary structures of the protein.

\* Corresponding author: *Sirous Ghobadi*

✉ E-mail: *ghobadi@razi.ac.ir*

Journal homepage:



## بررسی میان کنش ایرینوتکان (مشتق شده از آلكالوئید گیاهی کمپتوتسین) با آلبومین سرم انسانی با استفاده از روش‌های طیف سنجی و مطالعه محاسباتی

نوشین بیجاری<sup>1</sup>، سیروس قبادی<sup>2</sup>، کتابون درخشنده<sup>3\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳. استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۱-۳-۲۵

بازنگری: ۱۴۰۱-۴-۸

پذیرش: ۱۴۰۱-۵-۲۱

#### واژگان کلیدی:

آلكالوئید، خاموش‌کنندگی  
فلوئورسانس، انتقال انرژی  
رزونانس فلوئورسانس،  
آلبومین سرم انسانی،  
ایرینوتکان

### چکیده

داروی ایرینوتکان به‌عنوان یکی از موثرترین داروهای ضد سرطان برای درمان سرطان کولورکتال شناخته می‌شود در این مطالعه، نقش آلبومین سرم انسانی (HSA) به‌عنوان یک بیوپلیمر پروتئینی و سیستم دارورسانی ایمن در اتصال به ایرینوتکان مورد بررسی قرار گرفت. پیوند شدن ایرینوتکان به HSA به‌کمک روش‌های مختلف مانند فلوئوریمتری، دو رنگ‌نمایی دورانی (CD)، طیف‌سنجی فرو سرخ (FT-IR) و داکینگ مولکولی بررسی شد. تجزیه و تحلیل طیف‌های فلوئورسانس نشان داد که ایرینوتکان توانایی خاموش کردن طیف فلوئورسانس ذاتی HSA را از طریق مکانیسم خاموش‌کنندگی پایا دارا می‌باشد. پارامترهای پیوندی بر پایه معادله تغییر یافته اشترن-ولمر (Stem-Volmer)، برآورد شدند و تغییرات آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) و آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) به ترتیب  $1911 \text{ kJ mol}^{-1}$  و  $1380 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل پارامترهای ترمودینامیکی اتصال نشان داد که پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های آب‌گریز عامل اصلی پایداری کمپلکس ایرینوتکان-HSA می‌باشند. آزمایش‌های نشانگرهای رقابتی نشان داد که دارو به جایگاه I در HSA پیوند می‌شود که با داکینگ مولکولی مورد تایید قرار گرفت. فاصله ( $r$ ) میان HSA و ایرینوتکان بر پایه تئوری انتقال انرژی غیرتابشی فورستر (Förster) تعیین شد. آنالیز کمی طیف‌های CD فرابنفش-دور و FT-IR نشان داد که ایرینوتکان موجب القای تغییراتی در ساختارهای دوم و سوم پروتئین شده است.

\*نویسنده مسئول: سیروس قبادی

✉ E-mail: [ghobadi@razi.ac.ir](mailto:ghobadi@razi.ac.ir)  
Journal homepage:



## مقدمه

گیاهان دارای ترکیبات فعالی مانند آکالوئیدها، استروئیدها، تاننها، گلیکوزیدها، رزینها، فنلها و فلاونوئیدها هستند (Tonthubthimthong *et al.*, 2001). آکالوئیدها از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند و دارای ویژگی‌های شیمیایی منحصر به فردی بوده که آن‌ها را به کاندیدای مناسبی برای بهره برداری در پزشکی تبدیل کرده است (Heinrich *et al.*, 2021). این ترکیبات حدود بیست درصد از متابولیت‌های ثانویه گیاهان را تشکیل می‌دهند و در محیط اسیدی محلول در آب هستند و در محیط بازی و خنثی در لپیدها محلول‌اند. بر اساس منشأ اولیه، این ترکیبات به دو گروه آکالوئیدهای حقیقی یا پروتوآکالوئیدها و شبه آکالوئیدها دسته بندی می‌شوند. آکالوئیدهای حقیقی از اسیدهای آمینه مشتق می‌شوند و دارای گروه آمین هستند که در درون حلقه هتروسیکلیک آنان قرار ندارد، در حالی که شبه آکالوئیدها با منشأ غیر اسیدآمینه‌ای دارای حلقه‌های هتروسیکلیک با گروه‌های

نیتروژنه هستند (Rampogu *et al.*, 2022). آکالوئیدها در گروه‌های مختلفی مانند ایندول، تروپان، پیپریدین، پورین، پیرولیزیدین، پیرولیدین، کینولیزیدین و ایزوکینولین‌ها دسته‌بندی می‌شوند (Kaur *et al.*, 2015). آکالوئیدهایی مانند افرین و آتروپین برای درمان بیماری‌های تنفسی تجویز می‌شوند، در حالی که دیگر آکالوئیدها مانند وین کریستین، بربرین و وین بلاستین عملکرد ضد سرطانی دارند (Olofinsan *et al.*, 2023). برای نمونه، وین بلاستین با پیوند شدن به توبولین‌ها از تشکیل میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌کند و در نتیجه تقسیم سلولی در مرحله متافاز با مهار تشکیل دوک تقسیم دچار اختلال می‌شود (Kaur *et al.*, 2015). ماتادا و همکاران خواص ضد سرطانی آکالوئید پیرولوکینولین کمپوتوسین را توصیف کرده‌اند (Matada *et al.*, 2021)، کمپوتوسین یک آکالوئید گیاهی است که برای نخستین بار در اوایل دهه ۱۹۶۰ از گیاه *Camptotheca acuminata* که بومی چین است استخراج شد (Pi *et al.*,

۹-آمینو کمپتوتسین و ۹-نیترو کمپتوتسین گردید که بررسی‌های بالینی بر روی آن‌ها انجام شده است (Mathijseen *et al.*, 2001). ایرینوتکان یک آنالوگ نیمه سنتزی از کمپتوتسین است که به‌عنوان مهارکننده قوی آنزیم توپوایزومراز I رفتار می‌کند و دارای فرمول شیمیایی  $C_{33}H_{38}N_4O_6$  می‌باشد. ساختار شیمیایی ایرینوتکان در بالای شکل ۱ نشان داده شده است. فعالیت ضدتوموری ایرینوتکان در مدل‌های پیش‌بالینی و بالینی بر علیه سرطان‌های کولورکتال، ریه، سرویکس و تخمدان گزارش شده است (Kciuk, *et al.*, 2020). در بدن، زنجیره جانبی بزرگ ایرینوتکان توسط آنزیم کربوکسیلاستراز شکسته شده و متابولیت اصلی آن به‌نام SN-۳۸ تولید می‌گردد (Fuchs *et al.*, 2006). آنزیم یوریدین دی فسفات گلوکورونوزیل ترانسفراز با انتقال گلوکورونات به متابولیت فعال (SN-۳۸) باعث تولید متابولیت غیرفعال (SN-۳۸G) می‌شود که از طریق ادرار دفع می‌شود (Mathijssen *et al.*,

2010). امکان استخراج کمپتوتسین یا مشتقات آن از اندوفیت‌های کشت شده در بخش‌های مختلف گیاه فراهم شده است. ۱۰-هیدروکسی کمپتوتسین، به‌دست آمده از قارچ‌های اندوفیت *C. acuminata* (*Xylaria sp.*)، مهار رشد سلول‌های سرطان سینه را سبب می‌شود. فعالیت ضد توموری کمپتوتسین با مهار آنزیم توپوایزومراز I صورت می‌گیرد، هنگامی که چنگال همانندسازی به کمپلکس توپوایزومراز I-کمپتوتسین می‌رسد شکستی غیرقابل ترمیم در دو رشته DNA پدید می‌آید که به‌دنبال آن مرگ سلول سرطانی روی می‌دهد (Olofinsan *et al.*, 2023). اثر سمیت آلكالوئیدهای کمپتوتسین در سرطان خون با القای فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF) و مهار فعالیت توپوایزومراز I گزارش شده است (Kaur *et al.*, 2015). بروز عوارض جانبی شدید و غیرقابل پیش‌بینی کمپتوتسین در بررسی‌های بالینی نخستین (Hofmann *et al.*, 2005) باعث سنتز مشتقات گوناگونی از آن مانند ایرینوتکان، توپوتکان،

می‌دهد و از دیرباز مورد توجه صنعت داروسازی برای ساخت آنالوگ‌های فعال دارویی بوده است (Hodgson *et al.*, 2001). به‌منظور کنترل دوز بهینه یک دارو، برآورد میزان پیوند شدن دارو به پروتئین بسیار مهم می‌باشد (Xiumei *et al.*, 2009). هدف از این پژوهش بررسی میان‌کنش میان HSA و داروی ایرینوتکان با استفاده از روش‌هایی مانند فلوریمتری، دو رنگ‌نمایی دورانی (Circular Dichroism, CD)، طیف‌سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) و بررسی‌های داکینگ مولکولی است. با بررسی تغییرات و آنالیز داده‌های به‌دست آمده سرشت نیروهای میان‌کنش، تعداد جایگاه‌های پیوندی و همچنین تغییرات ساختاری پروتئین HSA در اثر پیوند شدن ایرینوتکان مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

(Atasilp *et al.*, 2017 & 2001)، در حالی‌که ایرینوتکان و SN-۳۸ از طریق سیستم صفراوی دفع می‌شوند (Ozawa *et al.*, 2021). به‌طور کلی پیوند شدن دارو به پروتئین‌های پلاسما ویژگی‌های فارماکوسینتیک آن را بهبود می‌بخشد، برای نمونه، نیمه عمر درون تنی یک دارو با پیوند شدن به پروتئین افزایش می‌یابد که سبب افزایش زمان تاثیرگذاری دارو می‌شود (Kunwar *et al.*, 2006). از سوی دیگر، پیوند شدن دارو به پروتئین باعث بهبود جذب، توزیع و حلالیت داروها شده، سمیت آن‌ها را کاهش می‌دهد و بر روی سرعت حذف آن‌ها تاثیر گذار است (Jiang *et al.*, 2007 & Kandagal *et al.*, 2008). آلبومین سرم انسانی (HSA) فراوان‌ترین پروتئین حامل در گردش خون انسان است و با تمایل بالایی در مقایسه با سایر پروتئین‌های موجود در پلاسما به داروها پیوند می‌گردد (Kandagal *et al.*, 2007). بررسی میان‌کنش‌های مولکولی میان پروتئین HSA و داروها اطلاعات مهمی در زمینه طراحی داروهای مؤثر ارائه

برای بررسی تاثیر داروی ایرینوتکان بر ساختار دوم و سوم پروتئین HSA، طیف‌های CD در دو بخش فرابنفش دور (۲۵۰-۱۹۰ nm) و نزدیک (۳۵۰-۲۵۰ nm) به‌وسیله دستگاه اسپکتروپولاریومتر Jasco مدل J-۸۱۰ ثبت شد. غلظت پروتئین در هر دو بخش دور و نزدیک به ترتیب ۰/۳ و ۱/۳ mg/ml بود. خروجی دستگاه Jasco بر پایه میلی‌درجه می‌باشد، از این‌رو، برای گزارش داده‌ها بر پایه میانگین بیضی‌واری باقیمانده (Mean Residue Ellipticity, MRE) از معادله (۱) استفاده شد:

$$MRE = \frac{\theta_{obs}}{C_{pnl} \times 10} \quad (1)$$

MRE میانگین بیضی‌واری باقیمانده بر پایه  $\theta_{obs}$ ،  $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  بیضی‌واری به‌دست آمده از دستگاه بر پایه  $C_p$ ،  $\text{mdeg}$  غلظت پروتئین بر پایه مولار،  $n$  تعداد اسیدآمین‌ه پروتئین و  $l$  پهنای مسیر گذر نور بر پایه  $\text{cm}$  می‌باشد (Kandagal *et al.*, 2006).

#### فلوئورسانس ذاتی

HSA و ایرینوتکان از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند و بدون نیاز به خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. تمام آزمایش‌ها در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۷۵ انجام شدند. غلظت پروتئین HSA به‌روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با بهره‌گیری از ضریب خاموشی آن ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) تعیین شد (Khan *et al.*, ۲۰۰۱). (2007).

#### طیف سنجی FT-IR

طیف‌های FT-IR ایرینوتکان، HSA و کمپلکس HSA- ایرینوتکان توسط اسپکتروفتومتر FT-IR Prestige ۲۱ (Shimadzu، ژاپن) ثبت شدند. نمونه‌های مورد نظر با برومید پتاسیم (KBr) مخلوط شده و در فشار ۹ تن به مدت ۵ دقیقه فشرده شدند تا دیسک‌های ۱۰ میلی‌متری به‌دست آید. طیف سنجی فرو سرخ از نمونه‌ها در بازه  $4000-500 \text{ cm}^{-1}$  انجام شد.

#### اندازه‌گیری‌های دورنگ‌نمایی دورانی (CD):

طیف‌های نشر فلئورسانس HSA ثبت شدند. برای برانگیختگی اسید آمینه تریپتوفان، طول موج برانگیختگی روی ۲۹۵ نانومتر تنظیم شد (Alam *et al.*, 2015). برای آنالیز داده‌های خاموش شونددگی فلئورسانس، از رابطه اشترن-ولمر استفاده شد:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

در این رابطه،  $F$  و  $F_0$  به ترتیب شدت فلئورسانس پروتئین در حضور و غیاب خاموش‌کننده (دارو)،  $K_{sv}$  ثابت خاموش‌کنندگی اشترن-ولمر،  $[Q]$  غلظت مولار خاموش‌کننده،  $k_q$  ثابت سرعت خاموش‌کنندگی دو مولکولی و  $\tau_0$  نیمه عمر بیومولکول در غیاب خاموش‌کننده است. با رسم نمودار  $F_0/F$  در برابر غلظت خاموش‌کننده  $[Q]$ ،  $K_{sv}$  از شیب خط به دست می‌آید. با بررسی روند تغییرات  $K_{sv}$  با دما، نوع مکانیسم خاموش‌کنندگی تعیین گردید (Yue *et al.*, 2017a).

#### تعیین تعداد جایگاه‌های پیوندی و نیروهای میان ایرینوتکان و HSA

طیف‌های نشر فلئورسانس توسط مد Scan دستگاه اسپکتروپلاریمتر Cary Eclipse (Varian) ثبت گردید. در همه اندازه‌گیری‌های فلئورسانس از بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷۵ و سل کوارتز با پهنای یک سانتی‌متر استفاده شده است. پهنای شکاف‌های برانگیختگی و نشر دستگاه به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شد. برای رفع مشکل اثر فیلتر درونی، داده‌های فلورسانس با استفاده از معادله ۲ اصلاح شد:

$$F_{corr} = F_{obs} \exp [(A_{ex} + A_{em}) / 2] \quad (2)$$

$F_{corr}$  و  $F_{obs}$  به ترتیب شدت فلئورسانس مشاهده شده و اصلاح شده هستند و  $A_{em}$  و  $A_{ex}$  به ترتیب جذب در طول موج‌های برانگیختگی و نشر را نشان می‌دهند (Seedher *et al.*, 2005).

#### تعیین مکانیسم خاموش‌کنندگی

برای تعیین مکانیسم خاموش‌کنندگی HSA توسط دارو، نشر فلئورسانس ذاتی پروتئین در سه دمای ۲۹۸، ۳۰۸ و ۳۱۳ کلونین ثبت شدند. پس از هر بار افزودن دارو، محلول ۱ دقیقه آنکوبه شده و سپس

نمودار و عرض از مبدأ به دست می‌آیند. با به دست آوردن مقادیر  $\Delta H^\circ$  و  $\Delta S^\circ$ ، به کمک معادله ۶ می‌توان تغییرات انرژی آزاد گیبس ( $\Delta G^\circ$ ) را محاسبه نمود (Seedher *et al.*, 2005).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (۶)$$

### انتقال انرژی فلئورسانس میان ابرینوتکان و پروتئین

به منظور برآورد فاصله میان لیگاند و تریپتوفان(های) موجود در پروتئین از رزونانس انتقال انرژی فوستر، بین یک فلئوفور دهنده فلئورسانس (تریپتوفان) و یک مولکول گیرنده فلئورسانس (لیگاند)، از معادله ۷ استفاده می‌شود (Yue *et al.*, 2016):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6} \quad (۷)$$

در این رابطه،  $F$  و  $F_0$  به ترتیب شدت نشر ذاتی فلئورسانس پروتئین در حضور و در غیاب دارو،  $r$ ، فاصله میان دهنده و گیرنده،  $R_0$  فاصله بحرانی (فاصله‌ای که در آن بازده انتقال انرژی ۵۰٪ است) و  $E$  بازده انتقال انرژی میان دهنده و پذیرنده می‌باشد. با کمک رابطه ۸ می‌توان مقدار  $R_0$

برای تعیین ثابت پیوندی و تعداد جایگاه پیوندی دارو در پروتئین HSA از رابطه ۴ استفاده شد.

$$\log \frac{[F_0 - F]}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (۴)$$

در این رابطه،  $F_0$  و  $F$  به ترتیب شدت فلئورسانس پروتئین در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف ابرینوتکان،  $K_b$  ثابت پیوند دارو و  $n$  تعداد جایگاه اتصال دارو در پروتئین می‌باشد. از شیب این نمودار مقدار  $n$  و از عرض از مبدأ آن مقدار  $\log K_b$  به دست آمد (Yue *et al.*, 2017b). برای تعیین نیروهای درگیر در پیوند دارو به پروتئین، پارامترهای ترمودینامیکی تغییرات آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) و تغییرات آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) با استفاده از نمودار وانت هوف محاسبه شد. نمودار وانت هوف (معادله ۵) با رسم نمودار  $\ln K_b$  در برابر  $1/T$  به دست می‌آید:

$$\ln K_b = - \quad (۵)$$

$$\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

در این معادله،  $K_b$  ثابت پیوند در یک دمای خاص و  $R$  ثابت جهانی گازهاست. مقادیر ( $\Delta H^\circ$ ) و ( $\Delta S^\circ$ ) به ترتیب از شیب



### آزمایش‌های رقابتی نشانگرها

برای تعیین جایگاه پیوندی ایرینوتکان در آلومین می‌توان از نشانگرهای جایگاه سود جست که هر یک به جایگاه ویژه‌ای در آلومین پیوند می‌شوند. در آزمایش رقابتی نشانگرهای جایگاه، از دو نشانگر وارفارین و ایوبروفن به‌عنوان پروب‌های فلئوئورسانس به‌ترتیب برای نشان دادن جایگاه‌های I و II در آلومین سرم انسانی استفاده شد (Liu *et al.*, 2015). در این آزمایش، نشر فلئوئورسانس محلول HSA-نشانگر (با غلظت‌های یکسان ۱ میکرومولار) در حالی ثبت شد که ایرینوتکان به‌تدریج از غلظت ۰ تا ۱۲۰ میکرومولار به این محلول افزوده می‌شد. آزمایش‌ها برای محلول HSA و هر نشانگر جایگاه به‌طور جداگانه انجام شد و طول موج برانگیختگی برابر با ۲۹۵ nm نانومتر انتخاب شد. مقادیر ثابت پیوند ( $K_b$ ) از عرض از مبدا نمودار  $\log [(F_0-F)/F]$  در برابر  $\log [\text{irinotecan}]$  به‌دست آمد (معادله ۴).

### مطالعات داکینگ

را محاسبه و فاصله میان مولکول‌های دهنده و گیرنده انرژی را برآورد نمود.

$$R_0^6 = 8/8 \times 10^{-25} K^2 N \Phi J \quad (8)$$

در این رابطه،  $K^2$  فاکتور جهت‌گیری فضایی دوقطبی‌های دهنده و پذیرنده،  $\Phi$  بازده کوانتایی مولکول دهنده در حضور پذیرنده،  $N$  ضریب شکست محیط و  $J$  میزان هم‌پوشانی فضایی میان طیف جذبی گیرنده و طیف نشری دهنده انرژی می‌باشد که با معادله ۹ محاسبه می‌گردد:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (9)$$

در این معادله،  $F(\lambda)$  میزان نشر مولکول دهنده انرژی در طول موج  $\lambda$  و  $\varepsilon(\lambda)$  ضریب جذب مولی مولکول گیرنده انرژی در طول موج  $\lambda$  می‌باشد. با انتگرال‌گیری از هم‌پوشانی طیف نشری دهنده با طیف جذبی گیرنده، مقدار  $J$  محاسبه می‌گردد (Rahman *et al.*, 2023). هم‌پوشانی طیف جذبی ایرینوتکان با غلظت (۳) میکرومولار) و طیف نشری HSA با غلظت (۳) میکرومولار) برای محاسبه بازده انتقال انرژی میان پروتئین HSA و ایرینوتکان اندازه‌گیری شد.

پروتئین و همچنین بخش‌های قابل توجهی از سطح پیرامونی را در بر بگیرد. جایگاه داکینگ روی HSA با ایجاد یک جعبه Grid با ابعاد  $X: 29/62$ ،  $Y: 31/81$  و  $Z: 23/15$  در پایان شبیه‌سازی داکینگ، کمپلکس دارو-HSA با پایدارترین انرژی به‌عنوان مطلوب‌ترین ساختار کمپلکس برای HSA پذیرفته شد. تصویرهای گرافیکی مولکولی توسط VMD نسخه 1.8.9 تهیه شد (Humphrey *et al.*, 1996).

### نتایج و بحث

#### مطالعات FT-IR

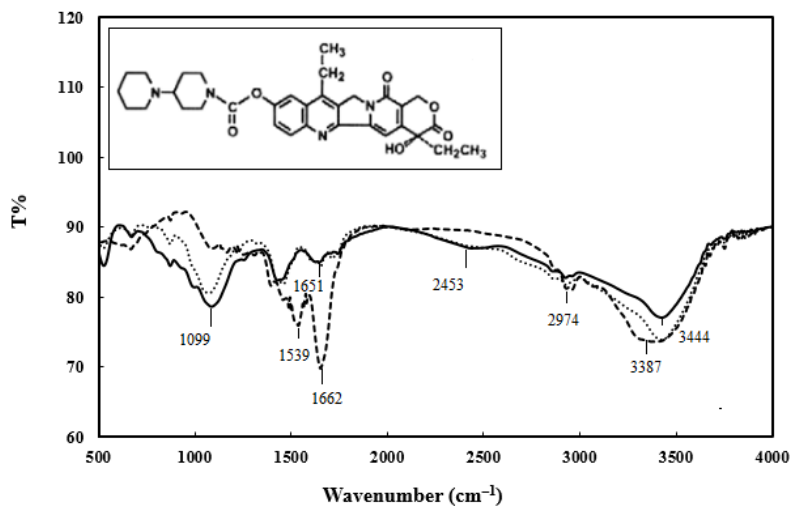
طیف‌سنجی FT-IR روشی سریع، دقیق و غیرمخرب برای شناسایی ترکیبات شیمیایی و گروه‌های عملکردی نمونه است و به تغییرات در ساختار مولکولی بسیار حساس است (Amir *et al.*, 2013). این تکنیک برای بررسی ساختار دوم پروتئین‌ها و تغییرات ساختاری ناشی از پیوند شدن لیگاند بسیار مفید است (Dakhakhni *et al.*, 2023). طیف FT-IR پروتئین‌ها،

ساختار کریستالی پروتئین آلبومین سرم انسانی (PDB:1BM0) از بانک اطلاعات پروتئین ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) دانلود شد. ساختار شیمیایی ایرینوتکان با نمای ۳ بعدی با استفاده از برنامه ۸/۰/۶ HyperChem با قالب PDB مدل‌سازی شد (Mohammadnia *et al.*, 2020). مطالعات داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار Auto Dock Vina انجام شد (Trott *et al.*, 2010). نرم افزار AutoDock Tools (ADT) نسخه ۱/۵/۴ (<http://mgltools.scripps.edu>) برای آماده سازی دارو و پروتئین برای داکینگ استفاده شد و ساختار بهینه دارو به‌عنوان ورودی نرم افزار ADT مورد بهره برداری قرار گرفت. پس از بارگذاری HSA در نرم افزار ADT، یک فایل با فرمت PDBQT از آن ایجاد شد که دارای ساختار پروتئین با هیدروژن‌ها در همه جایگاه‌های قطبی بود. همه پیوندها در لیگاند چرخش‌پذیر در نظر گرفته شد. با استفاده از AutoGrid Tools، مشخصات جعبه Grid به اندازه مناسب تعیین شد تا جایگاه‌های پیوندی

ایرینوتکان و کمپلکس ایرینوتکان-HSA در شکل ۱ نمایش داده شده است. همان‌گونه که در این شکل آشکار است، موقعیت پیک I و II در طیف HSA پس از پیوند شدن دارو اندکی جابه‌جا شده است. پیک I از  $1651 \text{ cm}^{-1}$  به  $1662 \text{ cm}^{-1}$  جابه‌جا شده است که نشان دهنده میان‌کنش دارو با گروه‌های C=O و C-N پروتئین است (He *et al.*, 2005). همچنین پس از پیوند شدن دارو، موقعیت پیک کششی C-N از  $2854 \text{ cm}^{-1}$  به  $2873 \text{ cm}^{-1}$  تغییر یافته است و پیک‌های نوظهوری در بازه‌های  $1539 \text{ cm}^{-1}$  و  $3387 \text{ cm}^{-1}$  ظاهر شده‌اند. طیف FT-IR ایرینوتکان، پیک‌هایی را در  $1076 \text{ cm}^{-1}$  و  $1431 \text{ cm}^{-1}$  نشان داده است که با تشکیل کمپلکس HSA-ایرینوتکان ناپدید شده‌اند. بازه طیفی  $1650 \text{ cm}^{-1}$  تا  $1658 \text{ cm}^{-1}$  در باندهای امید I به ساختار مارپیچ آلفا نسبت داده شده است (Jiang *et al.*, 2004a & Alhazmi *et al.*, 2023). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، شدت باند در این بازه پس از تشکیل

باندهای آمیدی گوناگونی که مشخصه نوسان‌های پیوندهای پپتیدی است را نشان می‌دهند. باندهای آمیدی که به‌وفور در مطالعات ساختاری پروتئین مورد بهره برداری قرار می‌گیرند شامل باندهای آمیدی I، II و III هستند که به تغییرات ساختاری پروتئین‌ها حساس هستند (Ganim *et al.*, 2006). باند امید I ( $1700 \text{ cm}^{-1}$ ) مربوط به نوسان‌های کششی پیوند C=O است، باند امید II ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ) ناشی از نوسان خمشی N-H جفت شده با نوسان کششی پیوند C-N است، و پیک بازه  $2800-2900 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به نوسان کششی پیوند C-N است (Kannan *et al.*, 2014). بازه طیفی  $1220 \text{ cm}^{-1}$  نیز مشخصه باند امید III می‌باشد (Jiang *et al.*, 2004a). پیک امید I حساسیت بالایی نسبت به تغییرات پیرامونی پیوندهای پپتیدی دارد، و از این‌رو این بازه از FT-IR برای به‌دست آوردن اطلاعاتی در مورد تغییرات ساختار دوم پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yue *et al.*, 2016). طیف‌های FT-IR پروتئین HSA

کمپلکس دارو و ایرینوتکان افزایش یافته است، که به معنای افزایش محتوای مارپیچی آلفا در HSA است. به طور کلی، تغییرات در موقعیت و شکل پیک‌ها نشان می‌دهد که ساختار دوم HSA پس از پیوند شدن دارو تغییر یافته است

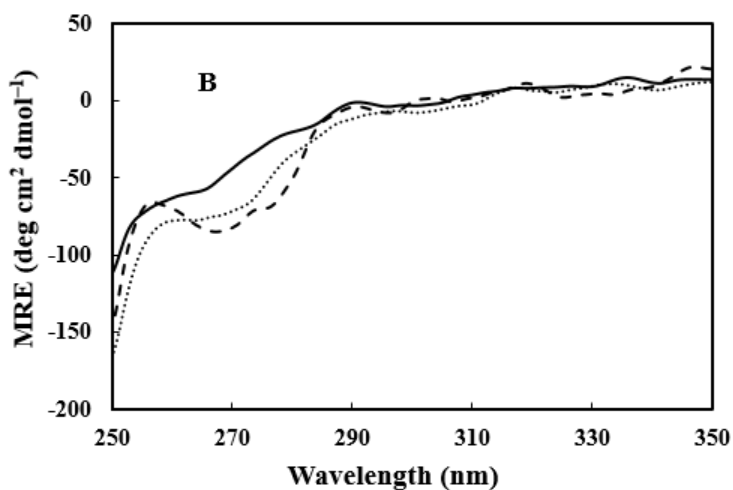
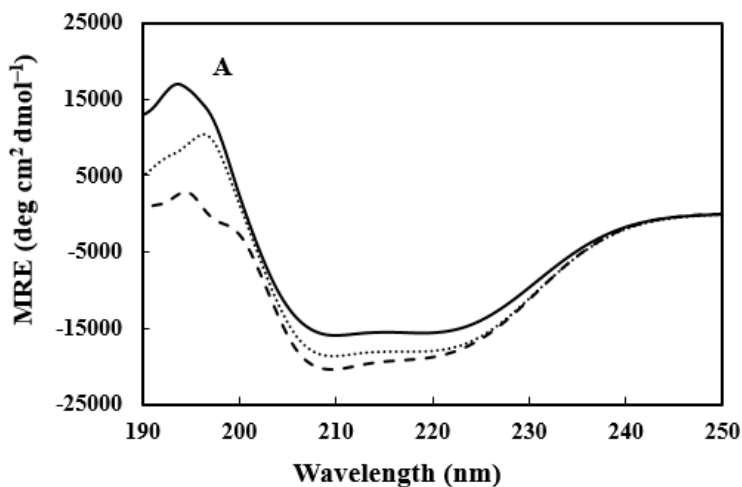


شکل ۱. طیف FT-IR پروتئین HSA (—)، ایرینوتکان (.....) و کمپلکس HSA - ایرینوتکان (----). ساختار شیمیایی ایرینوتکان در بالای شکل نشان داده شده است.

## اندازه‌گیری‌های CD

مطالعات طیف‌سنجی CD برای بررسی تغییرات ساختار دوم و سوم HSA پس از پیوند شدن به ایرینوتکان انجام شد (Li *et al.*, 2022). مطابق با مقالات پیشین، طیف CD فرابنفش-دور دارای دو باند منفی قوی در طول موج‌های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که مشخصه ساختار مارپیچ آلفای پروتئین است (Greenfield *et al.*, 2004 & Rogers *et al.*, 2006). اختلاف بین طیف‌های CD بازه فرابنفش-دور پروتئین HSA در حضور و غیاب دارو نشان می‌دهد که در حضور غلظت‌های افزایش‌یابنده دارو، شکل کلی طیف‌ها تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد، درحالی‌که بیضی‌واری منفی‌تر شده است (شکل ۲A). این جابه‌جایی نشان‌دهنده افزایش محتوای

مارپیچ آلفا در ساختار دوم پروتئین است که باعث القای فشردگی و پایداری ساختار آلفای پروتئین در نتیجه پیوند ایرینوتکان به پروتئین می‌شود (Alam *et al.*, 2015). به‌منظور تعقیب روند تغییرات ساختار سوم HSA در حضور دارو، طیف‌های CD در بازه فرابنفش نزدیک (۳۵۰-۲۵۰ نانومتر) در غیاب و در حضور غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار ایرینوتکان ثبت شد (شکل B ۲). مشاهدات حاکی از آن است که پیوند شدن دارو موجب افزایش بیضی‌واری در ۲۸۰ nm شده است که به کاهش انعطاف‌پذیری و القاء استحکام در ساختار سوم پروتئین نسبت داده می‌شود (Bijari *et al.*, 2015). در مجموع نتایج به‌دست آمده نشان داد پیوند شدن دارو باعث القای تغییراتی در ساختار دوم و سوم پروتئین شده است.

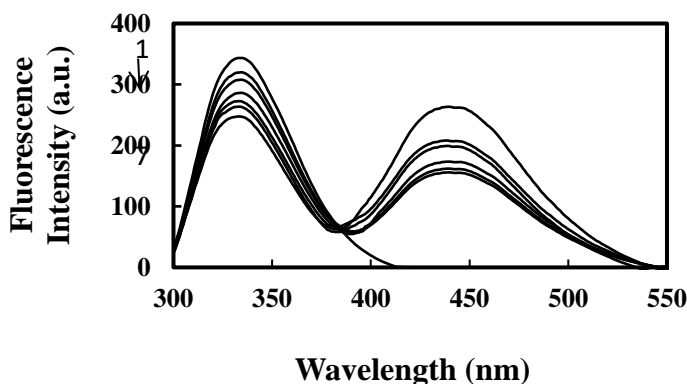


شکل ۲. (A) طیف‌های CD پروتئین HSA در بازه فرابنفش دور در غلظت‌های صفر (—)، ۵۰ (....) و ۱۵۰ (---) میکرومولار ایرینوتکان در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵. غلظت پروتئین ۰/۳ mg/ml بوده است. (B) طیف‌های CD پروتئین HSA در بازه فرابنفش نزدیک در غلظت‌های صفر (---)، ۵۰ (....) و ۱۵۰ (—) میکرومولار ایرینوتکان در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH ۷/۷۵. غلظت پروتئین ۱/۳ mg/ml بوده است.

## مطالعات فلئورسانس

کوتاه‌تر می‌شود که نشان دهنده کاهش قطبیت و افزایش آب‌گریزی محیط پیرامونی باقی‌مانده تریپتوفان موجود در HSA می‌باشد (Ranjbar *et al.*, 2012). همچنین پیدایش یک پیک جدید در طول موج ۴۴۰ نانومتر را می‌توان به پیوند شدن ایرینوتکان و انتقال انرژی فلئورسانس میان دهنده انرژی (HSA) و گیرنده انرژی (ایرینوتکان) نسبت داد (He *et al.*, 2005).

به دلیل حساسیت بالای فلئورسانس تریپتوفان می‌توان از آن به‌عنوان پروب درونی مهمی برای بررسی تغییرات ساختاری پروتئین در هنگام پیوند شدن لیگاند استفاده نمود (Khan *et al.*, 2019) (Balaei *et al.*, 2019). تغییرات در طیف نشر فلئورسانس ذاتی در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف داروی ایرینوتکان در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش غلظت دارو نشر فلئورسانس ذاتی پروتئین به‌طور منظم کاهش پیدا می‌کند که بیانگر میان‌کنش بین HSA و ایرینوتکان است. خاموش شوندگی نسبتاً بالا (حدود ۲۸٪) نشان می‌دهد که تنها باقی‌مانده تریپتوفان موجود در HSA در دسترس دارو قرار گرفته است (Seedher *et al.*, 2005). افزون بر پدیده خاموش شوندگی، پیوند شدن ایرینوتکان موجب اندکی جابه‌جایی (از ۳۳۵ نانومتر به ۳۳۱ نانومتر) در بیشینه‌ی نشر به‌سوی طول موج‌های



شکل ۳. طیف فلوروسانس ذاتی HSA در غیاب (۱) و در حضور غلظت‌های ۱۰ (۲)، ۲۰ (۳)، ۳۰ (۴)، ۵۰ (۵)، ۷۵ (۶) و ۱۰۰ میکرومولار (۷) ایرینوتکان. غلظت HSA ۵ میکرومولار و طول موج برانگیختگی ۲۹۵ nm بوده است.

برانگیخته رخ می‌دهد، در حالی که در خاموش شوندگی پایا فلورور در حالت پایه خود با مولکول خاموش کننده تشکیل کمپلکس می‌دهد (Sookai *et al.*, 2023). در خاموش شوندگی پایا افزایش دما منجر به کاهش پایداری کمپلکس (خاموش کننده-پروتئین) می‌شود، در نتیجه با افزایش دما ثابت خاموش شوندگی پایا کاهش می‌یابد. در خاموش شوندگی پایا با افزایش دما انتشار سریع‌تر و برخورد بیشتر میان فلورور و مولکول خاموش کننده رخ می‌دهد که منجر به افزایش ثابت خاموش شوندگی پایا می‌شود (Cui *et al.*, 2008). برای تعیین نوع مکانیسم خاموش کنندگی HSA توسط ایرینوتکان، آزمایش‌های خاموش شوندگی در سه دمای ۲۹۸، ۳۰۸ و ۳۱۳ کلوین انجام شد و

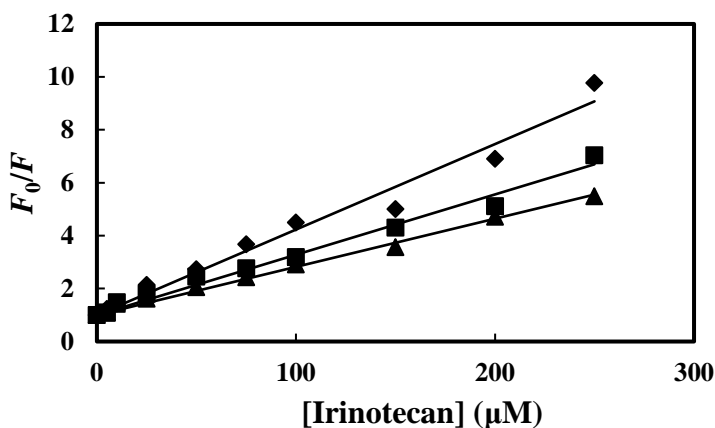
### تعیین مکانیسم خاموش شوندگی

میان کنش‌های مولکولی مانند ایجاد کمپلکس با حالت پایه، برخوردهای بین مولکولی، انتقالات انرژی و نوآرایی‌های مولکولی می‌تواند دلیل پدیده خاموش شوندگی فلوروسانس باشد (Cui *et al.*, 2008). خاموش شوندگی فلوروسانس به سه گروه خاموش شوندگی استاتیک (پایا)، دینامیک (پویا) و خاموش شوندگی هم‌زمان پایا و پویا تقسیم می‌شوند (Sun *et al.*, 2011). مکانیسم‌های خاموش شوندگی بر پایه اختلاف در وابستگی به دما و ویسکوزیته با هم متفاوت هستند (Cui *et al.*, 2008). در خاموش شوندگی پویا، برخورد بین فلورور و مولکول خاموش کننده در حالت



(2013, *et al.*)، این یافته مکانیسم خاموش شونده‌گی پایای HSA توسط ایرینوتکان را تایید می‌کند (Li *et al.*, 2022). این یافته‌ها نشان می‌دهد که خاموش شدن فلوروسانس HSA با تشکیل کمپلکس آغاز می‌شود و حتی اگر برخورد دینامیکی رخ داده باشد در بازه غلظتی مورد بررسی ناچیز است (Cui *et al.*, 2008)

نتایج در شکل ۴ و جدول ۱ نمایش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ثابت اشتراک-ولمر با افزایش دما کاهش پیدا کرده است، بنابراین مکانیسم خاموش کننده‌گی توسط ایرینوتکان احتمالاً از نوع خاموش کننده‌گی پایا است. مقادیر  $k_q$  محاسبه شده برای HSA (بر پایه معادله ۳) بزرگ‌تر از بیشترین ثابت خاموش شونده‌گی پویا ( $2 \times 10^{11} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) است (Zaidi



شکل ۴. نمودار اشتراک-ولمر خاموش شدن فلوروسانس HSA در دماهای ۲۹۸ (◆)، ۳۰۸ (○) و ۳۱۳ (▲) کلونین توسط ایرینوتکان. مقادیر ثابت خاموش شونده‌گی ( $K_{sv}$ ) از شیب نمودار اشتراک-ولمر محاسبه شده است. جدول ۱. مقادیر ثابت خاموش کننده‌گی ( $k_q$ ) و ( $K_{sv}$ )، در دماهای مختلف برای پروتئین HSA.

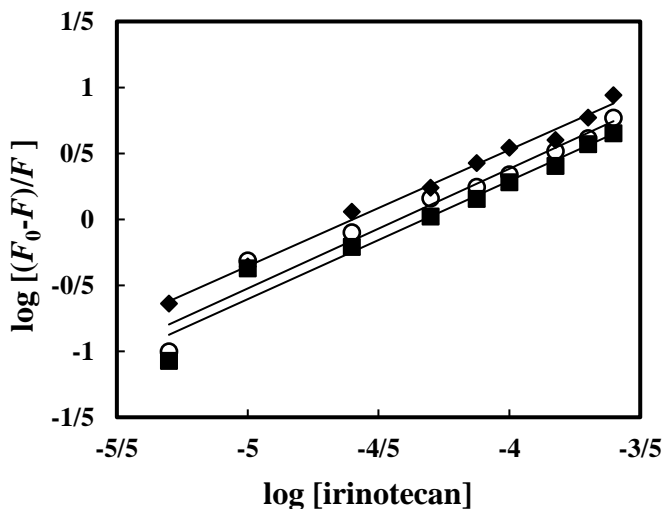
| Complex   | T (K) | $K_{sv} \times 10^{-4}$<br>( $\text{M}^{-1}$ ) | $k_q \times 10^{-12}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) | $R^2$ |
|-----------|-------|--|---|-------|
| Drug- HSA | ۲۹۸   | $32/30 \pm 0/85$                               | $32/30 \pm 0/85$  | ۰/۹۷۵ |
|           | ۳۰۸   | $22/79 \pm 0/86$                               | $22/79 \pm 0/86$  | ۰/۹۸۵ |
|           | ۳۱۳   | $18/21 \pm 0/33$                               | $18/21 \pm 0/33$  | ۰/۹۹۵ |

## محاسبه ثلث پیوندی و تعداد جایگاه‌های پیوندی

مقادیر ثابت پیوندی ( $K_b$ ) و تعداد جایگاه‌های پیوندی ( $n$ ) در HSA در سه دمای مورد نظر بر پایه شکل ۵ محاسبه و نتایج در جدول ۲ نمایش داده شده است. مقادیر  $n$  به دست آمده با استفاده از نمودار اشتراک-ولمر تقریباً برابر یک محاسبه شد که وجود یک جایگاه پیوندی برای دارو در ساختار پروتئین HSA را نشان می‌دهد. مقادیر ثابت پیوندی ( $K_b$ ) با افزایش دما کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش پایداری کمپلکس HSA-ایرینوتکان در دماهای بالاتر است. به عبارت دیگر، پیوند شدن ایرینوتکان به HSA با ایجاد کمپلکس HSA-ایرینوتکان همراه بوده است و افزایش دما منجر به جدا شدن کمپلکس شده است این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از بررسی مکانیسم خاموش شونده‌ی کاملاً سازگار است. نیروهای عمده درگیر در میان‌کنش میان یک لیگاند و ماکرومولکول در برگیرنده پیوندهای هیدروژنی، نیروهای واندروالس، نیروهای

الکتروستاتیک و میان‌کنش‌های آب‌گریز می‌باشند (Zaidi et al., 2013). برای شناسایی سرشت نیروهای درگیر در پیوند، پارامترهای ترمودینامیکی تغییرات آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) و آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) بر پایه رابطه وانت هوف به دست آمد. در ادامه به کمک معادله گیبس (رابطه ۶)، تغییر انرژی آزاد پیوند شدن ( $\Delta G^\circ$ ) محاسبه شد و مقادیر این پارامترها در جدول ۳ گزارش شده است. مقادیر منفی تغییرات انرژی آزاد ( $\Delta G^\circ$ ) حاکی از خودبه‌خودی بودن فرآیند پیوند می‌باشد.

تغییرات آنتالپی ( $\Delta H^\circ$ ) و آنتروپی ( $\Delta S^\circ$ ) به ترتیب  $19/11 \text{ kJ mol}^{-1}$  و  $1 \text{ J mol}^{-1}$  و  $13/80 \text{ K}^{-1}$  محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل پارامترهای ترمودینامیکی پیوندی بیانگر آن است که پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های آب‌گریز عامل اصلی پایداری کمپلکس ایرینوتکان-HSA می‌باشند (Sun et al., 2011).



شکل ۵. نمودار تغییرات  $\log [(F_0 - F)/F]$  در برابر  $\log [Q]$  مربوط به خاموش شدن نشر HSA توسط ایرینوتکان در سه دمای ۲۹۸ (◆)، ۳۰۸ (○) و ۳۱۳ (■) کلوین.  $F$  و  $F_0$  به ترتیب شدت نشر بیشینه پروتئین در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف ایرینوتکان است.

جدول ۲. مقادیر ثابت اتصال ( $K_b$ ) و تعداد جایگاه اتصال ( $n$ ) برای کمپلکس ایرینوتکان-HSA در دماهای مختلف.

| Complex   | $T$ (K) | $K_b \times 10^{-3}$ ( $M^{-1}$ ) | $(n)$           | $R^2$ |
|-----------|---------|-----------------------------------|-----------------|-------|
| Drug- HSA | ۲۹۸     | $۱۱/۳۷ \pm ۰/۲۳$                  | $۰/۸۸ \pm ۰/۰۲$ | ۰/۹۸۸ |
|           | ۳۰۸     | $۱۰/۲۸ \pm ۰/۴۹$                  | $۰/۹۱ \pm ۰/۰۴$ | ۰/۹۴۳ |
|           | ۳۱۳     | $۷/۵۵ \pm ۰/۳۹$                   | $۰/۹۰ \pm ۰/۰۴$ | ۰/۹۵۳ |

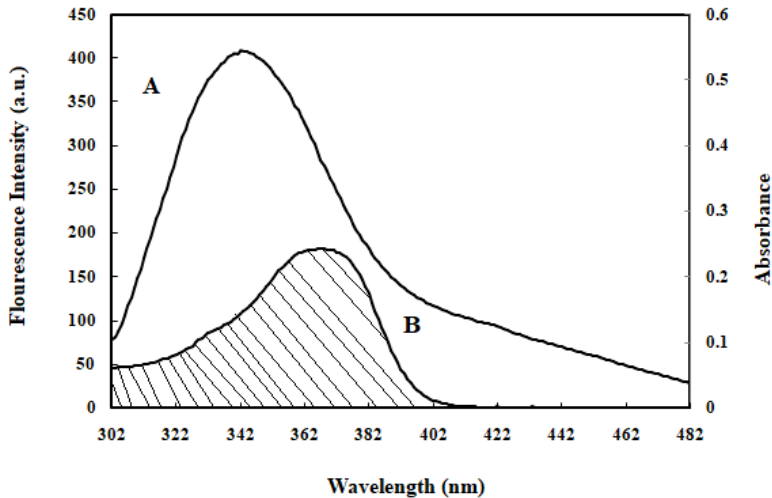
جدول ۳. پارامترهای ترمودینامیکی اتصال داروی ایرینوتکان به پروتئین HSA.

| Complex   | $T$ (K) | $\Delta S^\circ$ ( $J mol^{-1} K^{-1}$ ) | $\Delta H^\circ$ ( $kJ mol^{-1}$ ) | $\Delta G^\circ$ ( $kJ mol^{-1}$ ) |
|-----------|---------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| HSA -Drug | ۲۹۸     | $۱۳/۸۰ \pm ۲/۷۲$                         | $-۱۹/۱۱ \pm ۰/۸۳$                  | $-۲۳/۲۰ \pm ۱/۶۴$                  |
|           | ۳۰۸     |  |                                    | $-۲۳/۳۴ \pm ۱/۶۷$                  |
|           | ۳۱۳     |  |                                    | $-۲۳/۴۱ \pm ۱/۸۴$                  |

### انتقال انرژی میان HSA و ایرینوتکان

بر پایه تئوری انتقال انرژی غیرتابشی فورستر، انتقال انرژی میان فلئور دهنده و مولکول پذیرنده در صورتی که شرایط زیر برآورده شود می‌تواند رخ می‌دهد: (الف) مولکول دهنده، نشر فلئورسانس داشته باشد (ب) همپوشانی مناسب میان طیف نشری دهنده و طیف جذبی مولکول پذیرنده وجود داشته باشد و (ج) فاصله میان پذیرنده و دهنده برای انتقال انرژی بیش از ۷ نانومتر نباشد (Jiang *et al.*, 2004b & Ranjbar *et al.*, 2012). همپوشانی میان طیف نشر HSA و طیف جذبی ایرینوتکان در شکل ۶ نمایش داده شده است و با انتگرال‌گیری از بخش همپوشانی دو طیف، مقدار  $J$  برابر با  $10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$  محاسبه گردید. سپس با بهره‌گیری از معادله‌های ۸ و ۷ و با داشتن مقادیر  $\Phi = 0.12$ ,  $N = 1/36$ ,  $K^2 = \frac{2}{3}$  (Sun *et al.*, 2011) و همچنین مقدار  $J$  محاسبه شده، مقادیر  $R_0$  و  $r$  به ترتیب برابر با  $4/0.2 \text{ nm}$  و  $6/62 \text{ nm}$  محاسبه گردید.

همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، HSA دارای یک باقی‌مانده تریپتوفان است و  $r$  محاسبه شده در واقع فاصله میانگین بین داروی ایرینوتکان و Trp-۲۱۴ است. با توجه به این‌که  $r$  به‌دست آمده کمتر از  $1/5 R_0$  است و در بازه  $0 < r < 1/5 R_0$  می‌باشد، انتقال انرژی میان دهنده و گیرنده با احتمال بالا صورت گرفته است. با توجه به انتقال انرژی میان HSA و ایرینوتکان، کاهش شدت فلئورسانس پروتئین در اثر پیوند شدن دارو از طریق مکانیسم خاموش شونده پایا نیز تایید می‌شود.



شکل ۶. نمودار همپوشانی (A) طیف نشری مولکول دهنده (HSA) و (B) طیف جذبی مولکول پذیرنده (ایرینوتکان).

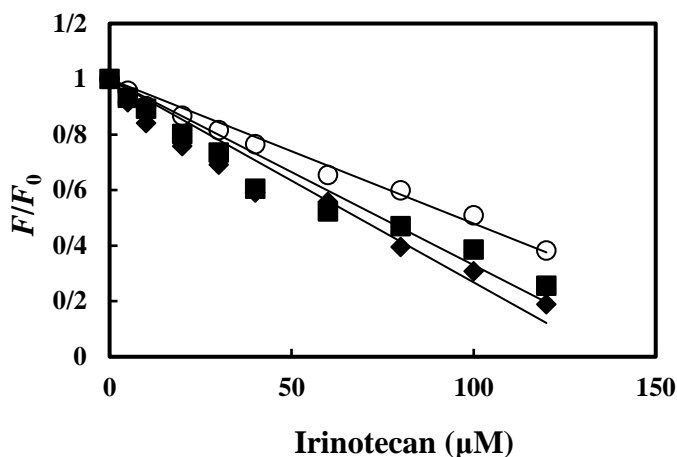
Sudlow I و Sudlow II شناخته می‌شوند که به ترتیب با زیردُمین‌های IIA و IIIA مطابقت دارند. جایگاه I به لیگاندهای هتروسیکل حجیم و دارای بار منفی پیوند می‌شود، در حالی که جایگاه II دارای میل ترکیبی برای اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک کوچک است (Rahman *et al.*, 2023). دو داروی ایبوپروفن و وارفارین به ترتیب به‌عنوان نشانگرهای جایگاه برای جایگاه Sudlow's site I و Sudlow's site II شناخته شده‌اند (Trynda-Lemiesz *et al.*, 1996 & Humphrey *et al.*, 2000). به‌منظور

#### آزمایش‌های رقابتی نشانگرها

HSA از سه دُمین هومولوگ (I, II و III) تشکیل شده است. هر دُمین نیز از دو زیردُمین A و B تشکیل شده است (Bertucci *et al.*, 1995). HSA دارای تعداد محدودی جایگاه پیوندی برای لیگاندهای درون‌زا و برون‌زا مانند متابولیت‌ها، هورمون‌ها، اسیدهای چرب و همچنین داروها است (Ghuman *et al.*, 2005). این پروتئین حامل دارای دو جایگاه پیوندی اصلی برای داروهاست که به نام جایگاه‌های

(1996, *al.*, از این رو، ایرینوتکان به عنوان یک داروی چند حلقه‌ای بزرگ به راحتی می‌تواند در زیردُمین IIA جای گیرد.

تعیین جایگاه پیوندی ایرینوتکان بر روی HSA، آزمایش‌های جابه‌جایی رقابتی نشانگر با استفاده از وارفارین و ایبوپروفن انجام شد. در این آزمایش‌ها، غلظت HSA، HSA + ایبوپروفن و HSA + وارفارین ثابت نگه داشته شد و غلظت ایرینوتکان تغییر یافت و فلورئورسانس ذاتی پروتئین ثبت شد. مقادیر ثابت پیوندی ( $K_b$ ) از عرض از مبدا نمودار  $\log[(F_0 - F)/F]$  در برابر  $\log[\text{irinotecan}]$  به دست آمد (شکل ۷). میزان خاموش شونده‌گی "HSA" و "HSA" در حضور هر دو نشانگر جایگاه " کاملاً متفاوت است. بر پایه معادله (۷)، ثابت‌های پیوندی در غیاب و حضور نشانگرهای جایگاه به دست آمد که در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که ایبوپروفن تاثیر کمی بر روی ثابت پیوندی ایرینوتکان به آلبومین دارد، در حالی که ثابت پیوندی در حضور وارفارین آشکارا کاهش یافته است. جایگاه I در زیردُمین بزرگ و نعطاف‌پذیر IIA قرار دارد که دارای تعداد زیادی جایگاه پیوندی تکی برای لیگندها است (Humphrey *et*



شکل ۷. پروفایل خاموش شونده‌ی HSA (◆)، HSA-ایبوپروفن (■) و HSA-وارفارین (○) در حضور غلظت‌های مختلف ایرینوتکان.

جدول ۴. ثابت‌های پیوندی در آزمایش‌های رقابتی میان نشانگرها و ایرینوتکان.

|                                    | $K_b \times 10^{-3} (M^{-1})$ | $R^2$ |
|------------------------------------|-------------------------------|-------|
| HSA + ایرینوتکان (در غیاب نشاگرها) | $12/53 \pm 0/64$              | ۰/۹۲  |
| HSA + ایرینوتکان + ایبوپروفن       | $10/57 \pm 1/11$              | ۰/۹۷  |
| HSA + ایرینوتکان + وارفارین        | $4/25 \pm 1/43$               | ۰/۹۵  |

موقعیت ۳۴ وجود دارد (Artali *et al.*, 2005). تنها اسید آمینه تریپتوفان پروتئین (Trp-۲۱۴) در زیردُمین IIA قرار دارد (شکل ۸) (Hongwei *et al.*, 2006). به منظور تایید نیروهای درگیر و جایگاه پیوندی ایرینوتکان، از داکینگ مولکولی برای شبیه‌سازی این میان‌کنش استفاده

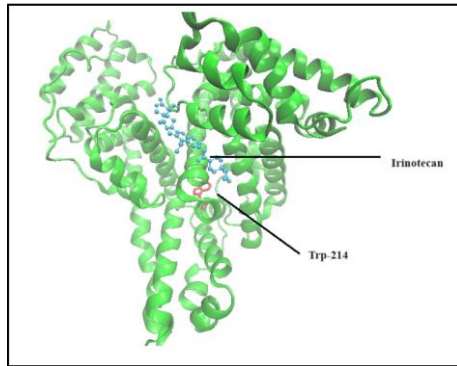
## داکینگ مولکولی

آلبومین سرم انسانی ماکرومولکولی مونومری و قلبی شکل با ۵۸۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۷ کیلو دالتون است که ۶۷٪ آن به صورت مارپیچ آلفاست و فاقد صفحات بتا می‌باشد. در ساختار این پروتئین ۱۷ پیوند دی سولفید و یک سیستئین آزاد در

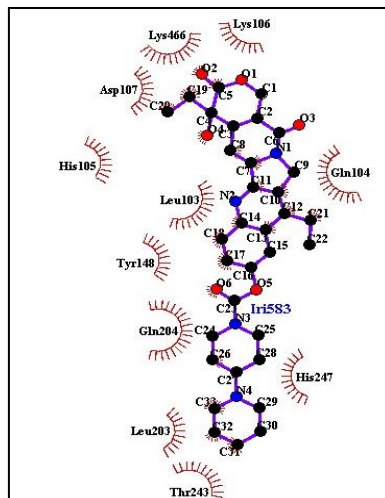
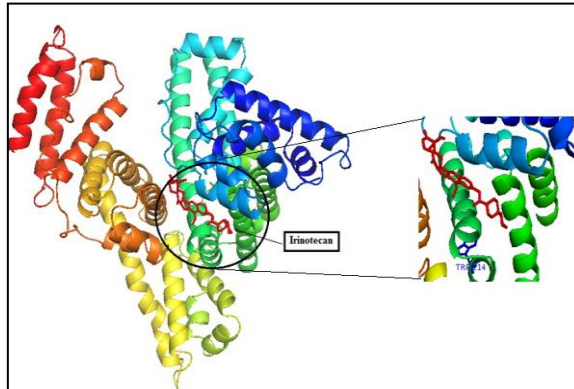
شد. نتایج داکینگ کمپلکس دارو و پروتئین با استفاده از نرم افزار PyMOL در شکل ۹ (بالا) نمایش داده شده است. ساختار نمایش داده شده از لحاظ انرژی پایدارترین ساختار را داشت. یافته‌ها نشان می‌دهند که ایرینوتکان در درون جایگاه Sudlow I دارای شش مارپیچ آلفا می‌باشد قرار گرفته است. این شکل نشان می‌دهد که Trp-۲۱۴ (تنها فلوئور موجود در پروتئین) در جایگاه I که نزدیک جایگاه پیوندی ایرینوتکان است، قرار گرفته است. اسیدهای آمینه اصلی که در میان‌کنش درگیر هستند در شکل ۹ (پایین) به صورت بزرگ‌شده نشان داده شده‌اند. این شکل با نرم افزار LigPlot (v.1.4 (<http://www.ebi.ac.uk>) تهیه شده و نشان می‌دهد که حلقه‌های آروماتیک ایرینوتکان در مجاورت باقی‌مانده‌های

آب‌گریز، Tyr-۱۴۸، Leu-۲۰۳ و ۱۰۳- Leu در زیردُمین IIA قرار دارند. همچنین در این شکل، موقعیت چندین باقی‌مانده یونی و قطبی مانند Lys-۲۶۶، Lys-۴۶۶، Lys-۱۰۶، Asp-۱۰۷، His-۲۴۷، His-۱۰۵ و His-۱۰۴ در نزدیکی لیگاند نمایش داده شده است. این میان‌کنش‌ها از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی (الکترواستاتیک) باعث پایداری مولکول ایرینوتکان می‌شوند. یافته‌های داکینگ مولکولی پیشنهاد می‌کنند که میان‌کنش میان HSA و دارو از طریق پیوندهای هیدروژنی و میان‌کنش‌های آب‌گریز روی می‌دهد که با آزمایش‌های جابه‌جایی (نشانگرهای جایگاه) و تجزیه و تحلیل ترمودینامیکی که نیروهای درگیر در پیوند شدن را پیشنهاد می‌دهد، به خوبی سازگاری دارد.





شکل ۸. ساختار آلبومین انسانی همراه با باقی‌مانده تریپتوفان آن در زیردُمین IIA.



شکل ۹. (بالا) ساختار کریستالی HSA، موقعیت تنها تریپتوفان ۲۱۴-Trp و جایگاه پیوندی ایرینوتکان در HSA. ساختار ایرینوتکان به رنگ قرمز و تریپتوفان به رنگ آبی نشان داده شده است. ساختار کریستالی پروتئین (1BM0) از بانک اطلاعات پروتئین گرفته شده است. (پایین) نمایش شماتیک اسیدهای آمینه مجاور ایرینوتکان در پروتئین HSA با استفاده از نرم افزار LigPlot.

## نتیجه‌گیری

سپس با آزمایش‌های پیوندی رقابتی و نیز نتایج داکینگ مولکولی مورد تایید قرار گرفت. طیف‌های CD در بازه فرابنفش دور آشکار ساخت که پیوند شدن ایرینوتکان بدون ایجاد تغییرات محسوسی در ساختار دوم پروتئین، باعث اندکی افزایش در محتوای ماریپیج آلفای HSA می‌شود که همراه با استحکام ساختار سوم آن است. بر پایه پدیده انتقال انرژی فلئوئورسانس، میانگین فاصله میان دارو و ۲۱۴-Trp در کمپلکس دارو-پروتئین ۶/۶۲ نانومتر برآورد شد. به‌خاطر پیوند شدن داروهای گوناگون به HSA (به‌عنوان یک مولکول حامل) به‌ویژه در شیمی درمانی، شناسایی سرشت میان‌کنش میان ایرینوتکان و HSA و تعیین

مطالعات پیوندی داروها به پروتئین‌هایز اهمیت HSA زمینه پژوهشی جالب توجهی به‌شمار می‌رود. در پژوهش حاضر، ما رویکردی را با به‌کارگیری تکنیک‌های گوناگون برای شناسایی سرشت میان‌کنش میان ایرینوتکان و HSA فراهم آورده‌ایم. داده‌های فلئوئورسانس آشکار ساخت که خاموش شدن فلئوئورسانس HSA توسط ایرینوتکان از طریق مکانیسم پایا روی می‌دهد و میان‌کنش‌های آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی نیروهای عمده پیوند دارو به HSA می‌باشند. همچنین این داده‌ها نشان دادند که دارو به نزدیکی تنها تریپتوفان پروتئین (۲۱۴-Trp) در حفره پیوندی واقع در زیردُمین IIA پیوند می‌شود. این یافته

جایگاه پیوندی دارو در ساختار پروتئین دارای اهمیت بسیاری می‌باشد.

### **سپاسگزاری**

نویسندگان از شورای پژوهشی دانشگاه رازی برای حمایت مالی از این پژوهش

قدردانی می‌نمایند. ما همچنین از خانم دکتر سهیلا کاشانیان و خانم دکتر فهیمه خیردوش برای کمک تکنیکی در آزمایش‌های CD سپاسگزاری می‌نماییم.

## منابع

- Alam, P., Chaturvedi, S.K., Anwar, T., Siddiqi, M.K., Ajmal, M.R., Badr, G., Mahmoud, M.H. and Khan, R.H. (2015). Biophysical and molecular docking insight into the interaction of cytosine  $\beta$ -D arabinofuranoside with human serum albumin. *Journal of Luminescence*, 164, 123–130.
- Alhazmi, H.A., Alam, M.D., Albratty, M., Najmi, A., Abdulhaq, A.A., Hassani, R., Ahsan, W. and Qramish, A.N. (2023). Binding investigation of some important metal ions copper (I), nickel (II), and aluminium (III) with bovine serum albumin using valid spectroscopic techniques. *Journal of Chemistry*, 35, 266–273.
- Amir, R.M., Anjum, F.M., Khan, M.I., Khan, M.R., Pasha, I. and Nadeem, M. (2013). Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *The Journal of Food Science and Technology*, 50, 1018–1023.
- Artali, R., Bombieri, G., Calabi, L. and Del Pra, A. (2005). A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites, *Farmaco*. 60, 485–495.
- Atasilp, C., Chansriwong, P., Sirachainan, E., Reungwetwattana, T., Puangpetch, A., Prommas, S., Sirilertrakul, S., Rerkarmnuaychoke, B., Wongwaisayawan, S. and Sukasem, C. (2017). Determination of irinotecan, SN-38 and SN-38 glucuronide using HPLC/MS/MS: Application in a clinical pharmacokinetic and personalized medicine in colorectal cancer patients.

- Journal of Clinical Laboratory Analysis, 32, e22217.
- Balaei, F. and Ghobadi, S. (2019). Hydrochlorothiazide binding to human serum albumin induces some compactness in the molecular structure of the protein: A multi-spectroscopic and computational study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 1–8.
  - Bertucci, C., Ascoli, G., Barretta, G.U., Bari, L.D. and Salvadori, P. (1995). The binding of 5-fluorouracil to native and modified human serum albumin: UV, CD, and  $^1\text{H}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 1087–1093.
  - Bijari, N., Ghobadi, S., Mahdiuni, H., Khodarahmi, R. and Ghadami, S.A. (2015). Spectroscopic and molecular modeling studies on binding of dorzolamide to bovine and human carbonic anhydrase II. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 189–199.
  - Cui, F., Qin, L., Zhang, G., Liu, Q., Yao, X. and Lei, B. (2008). Interaction of anthracycline disaccharide with human serum albumin: Investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1029–1036.
  - Dakhakhni, T.H. and Alsufyani, D. (2023). Biophysical investigation to assess the toxicity of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on rats blood serum: a FTIR spectroscopic study. *SN Applied Sciences*, 5, 1–8.
  - Fuchs, C., Mitchell, E.P. and Hoff, P.M. (2006). Irinotecan in the treatment of colorectal

- cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 32, 491–503.
- Ganim, Z. and Tokmakoff, A. (2006). Spectral signatures of heterogeneous protein ensembles revealed by MD simulations of 2DIR spectra. *Biophysical Journal*, 91, 2636–2646.
  - Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M. and Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 353, 38–52.
  - Greenfield, N.J. (2006). Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nature Protocols*, 1, 2733–2741.
  - Heinrich, M., Mah, J. and Amirkia, V. (2021). Alkaloids used as medicines: Structural phytochemistry meets biodiversity—An update and forward look. *Molecules*, 26, 1836.
  - He, W., Li, Y., Xue, C., Hu, Z., Chen, X. and Sheng, F. (2005). Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 1837–1845.
  - Hodgson, J. (2001). ADMET-turning chemicals into drugs. *Nature Biotechnology*, 19, 722–726.
  - Hofmann, C., Buttenschoen, K., Straeter, J., Henne-Bruns, D. and Kornmann, M. (2005). Pre-clinical evaluation of the activity of irinotecan as a basis for regional chemotherapy. *Anticancer Research*, 25, 795–804.
  - Hongwei, Z., Min, G., Zhaoxia, Z., Wenfeng, W. and Gozong, G. (2006). Spectroscopic studies on the interaction between riboflavin and albumins,

- Spectrochim. Acta, Part A 65, 811–817.
- Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33–38.
  - Jiang, M., Xie, M.X., Zheng, D., Liu, Y., Li, X.Y. and Chen, X. (2004a). Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 692, 71–80.
  - Jiang, C.Q. and Wang, T. (2004b). Study of the interactions between tetracycline analogues and lysozyme. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 2043–2047.
  - Jiang, Y.L. (2008). Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 6406–6414.
  - Kaur, R. and Arora, S. (2015). Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *Journal of Critical Reviews*, 2, 1–8.
  - Kandagal, P.B., Ashoka, S., Seetharamappa, J., Shaikh, S.M.T., Jadegoud, Y. and Ijare, O.B. (2006). Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 393–399.
  - Kandagal, P.B., Seetharamappa, J., Shaikh, S.M.T. and Manjunatha, D.H. (2007). Binding of

- trazodone hydrochloride with human serum albumin: A spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 185, 239–244.
- Kannan, S. (2014). FT-IR and EDS analysis of the seaweeds *Sargassum wightii* (brown algae) and *Gracilaria corticata* (red algae). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 341–351.
  - Kciuk, M., Marciniak, B. and Kontek, R. (2020). Irinotecan—Still an important player in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4919.
  - Khan, J.M., Malik, A., Ahmed, A., Rehman, M.T., AlAjmi, M.F., Khan, R.H., Fatima, S., Alamery, S.F. and Abdullah, E.M. (2019). Effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the conformation of a hen egg white lysozyme: A spectroscopic and molecular docking study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 219, 313–318.
  - Khan, S.N., Islam, B. and Khan, A.U. (2007). Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effect on structural state of protein. *International Journal of Integrative Biology*, 1, 102–112.
  - Kunwar, A., Barik, A., Pandey, R. and Priyadarsini, K.I. (2006). Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica Biophysica Acta*, 1760, 1513–1520.
  - Li, N., Yang, X., Chen, F., Zeng, G., Zhou, L., Li, X. and Tuo, X. (2022).



- Spectroscopic and in silico insight into the interaction between dicofol and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 264, 120277.
- Liu, J., Yue, Y., Wang, J., Yan, X., Liu, R., Sun, Y. and Li, X. (2015). Study of interaction between human serum albumin and three phenanthridine derivatives: fluorescence spectroscopy and computational approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145, 473–481.
  - Matada, B.S., Pattanashettar, R. and Yernale, N.G. (2021). A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 32, 115973.
  - Mathijssen, R.H., van Alphen, R.J., Verweij, J., Loos, W.J., Nooter, K., Stoter, G. and Sparreboom, A. (2001). Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clinical Cancer Research*, 7, 2182–2194.
  - Mohammadnia, F., Fatemi, M.H. and Taghizadeh, S.M. (2020). Study on the interaction of anti-inflammatory drugs with human serum albumin using molecular docking, quantitative structure–activity relationship, and fluorescence spectroscopy. *Luminescence*, 35, 266–273.
  - Olofinisan, K., Abrahamse, H. and George, B.P. (2023). Therapeutic role of alkaloids and alkaloid derivatives in cancer management. *Molecules*, 28, 5578.
  - Ozawa, S., Miura, T. and Terashima, J., Habano, W. (2021). Cellular irinotecan resistance in colorectal cancer and overcoming irinotecan refractoriness through various combination trials including DNA

- methyltransferase inhibitors: a review. *Cancer Drug Resistance*, 4, 946–964.
- Pi, Y., Jiang, K., Hou, R., Gong, Y., Lin, J., Sun, X. and Tang, K. (2010). Examination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* plant and cell culture, and the affected yields under several cell culture treatments. *Biocell*, 34, 139–143.
  - Rahman, S., Iram, S., Rehman, M.T, Hussain, A., Jan, A.T. and Kim, J. (2023). Study of amiloride binding to human serum albumin: insights from thermodynamic, spectroscopic, and molecular docking investigations. *Molecules*, 28, 7688.
  - Ranjbar, S., Ghobadi, S., Khodarahmi, R. and Nemati, H. (2012). Spectroscopic characterization of furosemide binding to human carbonic anhydrase II. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 910–917.
  - Rampogu, S., Balasubramaniyam, T. and Lee, J.H. (2022). Phytotherapeutic applications of alkaloids in treating breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 155, 113760.
  - Rogers, D.M. and Hirst, J.D. (2004). First principles calculations of protein circular dichroism in the near-ultraviolet. *Biochemistry*, 43, 11092–11102.
  - Seedher, N. and Bhatia, S. (2005). Mechanism of interaction of the non-steroidal anti-inflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 257–262.

- Sookai, S. and Munro, Q.Q. (2023). Spectroscopic and computational study of the interaction of Pt (II) pyrrole-imine chelates with human serum albumin. *Dalton Trans*, 52, 14774–14789.
- Sun, Y., Wei, S., Yin, C., Liu, L., Hu, C., Zhao, Y., Ye, Y., Hu, X. and Fan, J. (2011). Synthesis and spectroscopic characterization of 4-butoxyethoxy-N-octadecyl-1,8-naphthalimide as a new fluorescent probe for the determination of proteins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 3798–3804.
- Tonthubthimthong, P., Chuaprasert, S., Douglas, P. and Luewisutthichat, W. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of nimbin from neem seeds an experimental study. *Journal of Food Engineering*, 47, 289–293.
- Trott, O. and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461.
- Trynda-Lemiesz, L., Karaczyn, A., Keppler, B.K. and Kozowski, H. (2000). Studies on the interactions between human serum albumin and trans-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate (III). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 78, 341–346.
- Xiumei, L., Shuyan, L., Jingshu, Z. and Xingguo, C. (2009). Flow injection-capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of the interactions of a series of drugs with human serum albumin. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877, 3144–3150.
- Yue, Y., Sun, Y., Dong, Q., Liu, R., Yan, X., Zhang, X.

- and Liu, J. (2016). Interaction of human serum albumin with novel imidazole derivatives studied by spectroscopy and molecular docking. *Luminescence*, 31, 671–681.
- Yue, Y., Zhao, S., Sun, Y., Yan, X., Liu, J. and Zhang, J. (2017a). Effects of plant extract aurantio-obtusin on pepsin structure: Spectroscopic characterization and docking simulation. *Journal of Luminescence*, 187, 333–339.
  - Yue, Y., Zhao, S., Liu, J., Yan, X. and Sun, Y. (2017b). Probing the binding properties of dicyandiamide with pepsin by spectroscopy and docking methods. *Chemosphere*, 185, 1056–1062.
  - Zaidi, N., Ajmal, M.R., Rabbani, G., Ahmad, E. and Khan, R.H. (2013). A comprehensive insight into binding of hippuric acid to human serum albumin: a study to uncover its impaired elimination through hemodialysis. *PLoS One*, 8, e71422.