

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ННІ «Фізико-технічний факультет»

Кафедра Медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

## Пояснювальна записка

До дипломної роботи бакалавра

на тему (укр. мова) Мультилігандний докінг поліфенолів з функціональними білками

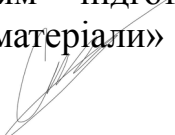
---

на тему (англ. мова) Multi-ligand docking of polyphenols with functional proteins

---

Виконала: студентка 4 курсу, групи ТБ-41

Напрямок підготовки 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»

  
Катерина СІЧКАР

---

(підпис, прізвище та ініціали)

Науковий керівник:  Валерія ТРУСОВА

---

(підпис, прізвище та ініціали)

Рецензент:

  
Денис ЧУДАК

---

(підпис, прізвище та ініціали)

## АНОТАЦІЯ

Січкарь К.О. – Мультилігандний докінг поліфенолів з функціональними білками. – Рукопис.

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Харків, 2025.

61 с., 4 рис., 4 табл., 34 джерел.

Поліфеноли, завдяки своїм вираженим антиоксидантним властивостям, сприяють зниженню ризику розвитку хронічних захворювань людини. Водночас їхнє практичне застосування у складі харчових добавок та лікарських засобів обмежене через низьку стабільність та водорозчинність. Метою даної роботи було оцінка можливості використання функціональних білків (альбуміну та інсуліну) як нанотранспортерів для бінарних і потрійних комбінацій поліфенолів. За допомогою трьохетапного молекулярного докінгу встановлено, що декілька поліфенольних сполук можуть одночасно зв'язуватись, переважно із субдоменом ІВ альбуміну, утворюючи водневі, гідрофобні та  $\pi$ – $\pi$  взаємодії. Виявлено, що досліджені поліфеноли формують більш стабільні комплекси з альбуміном, ніж з інсуліном. Зокрема, альбумін продемонстрував найвищу ефективність як нанопереносник для потрійних комбінацій галової кислоти з іншими сполуками (саліцилова кислота, кверцетин, сезамін чи куркумін), особливо за умови додавання третього компонента на фінальному етапі докінгу. Водночас, у ряді випадків найбільш стабільними виявилися комплекси альбуміну з бінарними комбінаціями поліфенолів. Отримані результати можуть бути корисними для подальшої розробки ефективних нанотранспортних систем на основі альбуміну для доставки комбінованих поліфенольних препаратів у поліфармакотерапії.

Ключові слова: поліфеноли, молекулярний докінг, водневі зв'язки, гідрофобні та ароматичні зв'язки, скорингова функція, стабільність комплексу білок-поліфеноли

## SUMMARY

Sichkar K.O. – Multi-ligand docking of polyphenols with functional proteins. – Manuscript.

Bachelor's thesis in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" –

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2025.

61 pages, 4 figures, 4 tables, 34 sources.

Due to their pronounced antioxidant properties, polyphenols contribute to reducing the risk of chronic human diseases. However, their practical application in dietary supplements and pharmaceuticals is limited by low stability and poor water solubility. The aim of this study was to evaluate the potential use of functional proteins (albumin and insulin) as nanocarriers for binary and ternary combinations of polyphenols. Using a three-stage molecular docking approach, it was shown that several polyphenolic compounds can simultaneously bind predominantly to subdomain IB of albumin via hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and  $\pi$ - $\pi$  stacking. It was found that the investigated polyphenols form more stable complexes with albumin than with insulin. In particular, albumin demonstrated the highest efficiency as a nanocarrier for ternary combinations of gallic acid with other compounds (such as salicylic acid, quercetin, sesamin, or curcumin), especially when the third component was added during the final docking stage. In some cases, however, the most stable complexes were observed for binary polyphenol combinations with albumin. The obtained results may be useful for the further development of efficient albumin-based nanocarrier systems for the delivery of combined polyphenol formulations in polypharmacotherapy.

Keywords: polyphenols, molecular docking, hydrogen bonds, hydrophobic and aromatic bonds, scoring function, stability of the protein-polyphenol complex.

## ЗМІСТ

Помилка: джерело посилання не знайдено

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....                                                                      | 5  |
| ВСТУП.....                                                                                                       | 6  |
| РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....                                                                                | 9  |
| РОЗДІЛ 1.1. ПОЛІФЕНОЛИ – БІОАКТИВНІ СПОЛУКИ, ЩО МАЮТЬ<br>АНТИОКСИДАНТНІ ТА ІНШІ ЛІКУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ.....      | 9  |
| РОЗДІЛ 1.2. ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІЛКИ ЯК НАНОПЕРЕНОСНИКИ ДЛЯ<br>ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН.....                                | 13 |
| РОЗДІЛ 1.3. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ.....                                                                             | 20 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....                                                                                | 25 |
| РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ АЛЬБУМІНУ ТА<br>ІНСУЛІНУ У ЯКОСТІ НАНОПЕРЕНОСНИКІВ ПОЛІФЕНОЛІВ.....     | 28 |
| РОЗДІЛ 3.1. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ КОМПЛЕКСІВ БІЛКІВ З<br>ПОЛІФЕНОЛАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ..... | 28 |
| РОЗДІЛ 3.2. АНАЛІЗ САЙТІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКІВ ДЛЯ ПОЛІФЕНОЛІВ<br>НА ОСНОВІ ДАНИХ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ.....       | 34 |
| ВИСНОВКИ.....                                                                                                    | 56 |
| ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                                                                 | 58 |

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ**

ПФ — поліфеноли

ALB — альбумін людини

INS — інсулін людини

GAL — галова кислота

PHEN — фенольна (саліцилова) кислота

CUR\_E — куркумін (енольна форма)

CUR\_K — куркумін (кето-форма)

QUER — кверцетин

RES — ресвератол

SES — сезамін

## ВСТУП

Поліфеноли – вторинні метаболіти рослин, які мають у складі одне чи більше ароматичних кілець, яке несе мінімум одну гідроксильну групу. Поліфеноли представлені фенольними кислотами, флавоноїдами, лігнанами, стильбенами та куркуміноїдами [1]. Поліфеноли мають сильні антиоксидантні властивості, а також утворюють функціональні комплекси з мембранними білками, відповідальними за регуляцію метаболізму [2], тому вживання поліфенолів у їжу призводить до зниження ризику серцево-судинних захворювань, діабету II типу, покращення когнітивних здібностей, протизапальних ефектів [3]. Ресвератол, куркумін та епігалокатехін-3-галат вважаються найбільш безпечними поліфенолами і їх рекомендовано у якості харчових добавок Управлінням з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами Сполучених Штатів Америки (FDA).

Однак через низьку біодоступність та високу здатність метаболізуватися в організмі поліфеноли мають обмежений біологічний ефект, тому раціональним видається дизайн наносистем доставки поліфенолів до тканин-мішеней для лікування різних захворювань [4].

Використання білків у якості біосумісних наносистем доставки поліфенолів дозволяє збільшити їх стабільність та період напівжиття у крові, підвищуючи фармакотерапевтичний ефект. Такий результат досягається завдяки нековалентній взаємодії поліфенолів з білковими молекулами (за допомогою формування водневих контактів та гідрофобних взаємодій), причому афінність поліфенолів до макромолекул регулюється фізико-хімічними умовами середовища та залежить від структури поліфенолів і білків [5].

Альбумін – високомолекулярний білок плазми крові, який підтримує колоїдно-осмотичний тиск всередині судин, транспортує вітаміни, гормони, бере участь у коагуляції та виконує багато інших біологічних функцій [6]. Альбумін часто використовується у якості нанопереносника до клітин-

мішеней антибіотиків, антикоагулянтів, протизапальних засобів тощо завдяки здатності до біодеградації, низькій імунотоксичності [6].

Інсулін людини, невеликий гормон білкової природи, значно впливає на ріст клітин, гомеостаз глюкози, загальний метаболізм людини [7]. Цей білок, за даними нещодавніх досліджень, може знижувати запальні стани у людини як завдяки зниженню рівня глюкози у крові, так я за допомогою прямого інгібування НАДФ-оксидази [8]. Інсулін майже не використовується як нанопереносник лікарських речовин, але нещодавні наукові результати показали, що інгаляційний інсулін можна використовувати у якості нанотранспортера (допоміжного засобу) для лікування респіраторних захворювань [9].

З огляду на те, що існуючі системи доставки поліфенолів білковими нанопереносниками, зокрема, альбуміном, є неосконалыми, бо наночастинки можуть поглинатися фагоцитарними клітинами, погано регулювати вивільнення лікарських речовин з наноконтейнера тощо, а потенціал інсуліну як нанопереносника лікарських речовин практично не досліджено, актуальним є удосконалення систем доставки ліків на основі білків. Дослідження зв'язування білків-нанопереносників з комбінаціями декількох поліфенолів дозволить підвищити навантаження наноконтейнерів і як наслідок, ефективність фармпрепаратів, а також надасть можливість використати отримані результати у поліфармакотерапії, що базується на лікуванні тяжких патологічних станів за допомогою двох і більше лікарських речовин, які діють одночасно на кілька мішеней [10].

Молекулярний докінг – процес молекулярного моделювання, метою якого є генерування комплексів білка з лігандом за принципом геометричної та хімічної компліментарності, оцінка енергії зв'язування ліганду з білком за допомогою скорингової функції та виявлення найбільш енергетично стабільних комплексів, який використовують для віртуального скринінгу у *in silico* structure-based drug design (дизайні лікарських речовин на основі структури макромолекули-мішені) [11].

**Метою** даної роботи було оцінити можливість розробки нанопереносників бінарних та потрійних комбінацій поліфенолів на основі альбуміну та інсуліну. Для виконання мети було поставлено та вирішено наступні завдання: 1) провести муьтилігандний докінг поліфенолів (галої та саліцилої кислот, енольної та кето-форм куркуміну, кверцетину, ресвератолу та сезаміну) з обраними білками; 2) порівняти значення енергій зв'язування найбільш енергетично вигідних комплексів білок-поліфеноли; 3) проаналізувати сайти зв'язування та типи нековалентних взаємодій поліфенолів на білках у Discovery Studio; 4) на основі отриманих результатів запропонувати комбінації поліфенолів, які формують найстабільніші комплекси з білками.



## РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### РОЗДІЛ 1.1. ПОЛІФЕНОЛИ – БІОАКТИВНІ СПОЛУКИ, ЩО МАЮТЬ АНТИОКСИДАНТНІ ТА ІНШІ ЛІКУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ

Серед найбільш поширених вторинних метаболітів, які синтезують рослини, понад 8000 є поліфенолами. Ці молекули можуть бути малими (наприклад, фенольні кислоти) і дуже високополімеризованими (зокрема, таніни). **Усі поліфеноли мають як мінімум одне ароматичне кільце, яке несе одну або декілька гідроксильних груп**, та утворюються за допомогою фенілпропаноїдного шляху метаболізму, у якому фенілаланін є вихідною речовиною.

Наукові дослідження показують, що вживання поліфенолів у їжу призводить до зниження захворюваності людини на неінфекційні хвороби, зокрема серцево-судинних захворювань та діабету II типу, які часто тісно пов'язані з великою кількістю активних форм кисню [3]. Поліфеноли мають дуже відомі антиоксидантні властивості, а також здатні впливати на активність факторів транскрипції, і таким чином змінювати експресію генів. Найчастіше у харчові продукти додають ресвератол, куркумін, кверцетин [1].

Поліфеноли представлені фенольними кислотами, **флавоноїдами**, **лігнанами**, **стильбенами** та **куркуміноїдами**. Наприклад, кверцетин міститься у багатьох рослинних продуктах, флаванони - у цитрусових, флоридзин - у яблуках. Цікаво, що очищення овочів та фруктів, тривалість зберігання та зрілість впливають на вміст поліфенолів у цих продуктах, бо найбільша концентрація поліфенолів знаходиться у зовнішніх їх частинах.

Фенольні кислоти є похідними коричної чи бензойної кислоти, наприклад, **галова**, ванільна, **саліцилова**, пікумарова кислоти. Зв'язані фенольні кислоти знаходяться у зернових продуктах, а вільні - у фруктах та

овочах. У харчових технологіях застосовують фенольні кислоти для консервування продуктів [12]. Структура фенольних кислот впливає на їх афінність до альбуміну людини, від чого залежить біорозподіл, метаболізм, вільна концентрація фенольних кислот у крові а їх біоактивність [13].

**Саліцилова кислота** – це рослинний компонент, який входить до складу антибактеріальних протизапальних та протигрибкових ліків. Однак 50% об'єму цієї лікарської речовини розкладається під час приорального застосування, необхідність пошуку нанопереносників для покращення біодоступності саліцилової кислоти [14].

**Галова кислота** – це не ферментативний оксидант, який міститься у зеленому чаї, винограді, корі дуба лимонах, галових горіхах, та має високу протигрибкову, проти ракову та противірусну активність. Дофамінергічні нейрони характеризується чутливістю до високої концентрації активних форм кисню завдяки високому рівню дофаміну. Активні форми кисню формуються шляхом окислення дофаміну, але надмірна їх виділення виникає пошкодження клітин та розвитку хвороби Паркінсона. Галова кислота може бути суттєвим доповненням терапії даного захворювання, оскільки вона, наприклад, запобігала когнітивному дефіциті щурів завдяки високому антиоксидантному захисту їх головного мозку. Крім того, галова кислота інгібує формування амілоїдних фібрил альфа-синуклеїну, що додатково може пригнічувати розвиток хвороби Паркінсона. Однак ендотеліальні мембрани та складені щільні контакти між ліпофільними ендотеліальними клітинами гематоенцефалічного бар'єру головного мозку запобігають ефективній доставці багатьох лікарських речовин, зокрема галової кислоти, у мозок. Тому галова кислота повинна бути включена до наночастинок, які здатні успішно транспортувати її через гематоенцефалічний бар'єр, знизити токсичні ефекти та захистити від ферментативного розпаду [15].

**Лігнани** також містяться у житі, вівсі, висівках, насіннях соняшника, льону, кунжуту та гарбуза, бобах, ягодах та овочах. Щодо картоплі та грибів, вони містять невелику кількість лігнанів. Прикладом лігнанів є **сезамін**, який

міститься у кунжутній олії та має протизапальні та імуномодулюючі ефекти [16].

Попередником флавоноїду **кверцетину** є ізокверцетин, який гідролізується у тонкому кишківнику та всмоктується. Цей флавоноїд міститься у винограді, яблуках, броколі, перцю, червоні цибулі, помідорах, чорному та зеленому чаї, у вині. Під час термічної обробки їжа, зокрема цибуля, втрачає більшу частину кверцетину, що у ній міститься. Кверцетин стимулює секрецію інсуліну, його вживання є корисною профілактикою проти цукрового діабету другого типу [17].

Катехіни, зокрема, епігалокатехін-3-галат (EGCG, що містить у складі галієву кислоту), містяться у чаю, какао та бобових стручках. Нещодавні дослідження виявили, що вживання зеленого чаю знижує ризик хронічних серцево-судинних захворювань [18]. EGCG пригнічує розвиток раку завдяки наявності галоїльної структурної групи.

**Ресвератол** є прикладом стильбенів. Ресвератол виробляється у винограді, арахісі, ягодах у відповідь на дію різноманітних стресових чинників або патогенів, та має широкий спектр біологічної активності [1].

Серед куркуміноїдів найбільш дослідженим є **куркумін**, який відповідає за жовтий колір куркуми (рослина з родини імбирних). Куркумін використовують як ароматизатор для харчових продуктів, у косметиці та харчових добавках. Куркумін є неполярним поліфенолом, який існує у кето-формі ( $\beta$ -дикетонівій формі) та еноальній формі. Кето-форма переважає у нейтральних та кислих середовищах, а енольна - у лужних розчинах [19]. Цікаво, що ароматичні кільця куркуміну мають гідрокси- та метокси- групи, на відміну від інших куркуміноїдів.

Завдяки корисним властивостям поліфенолів за останні десятиріччя виготовляється дуже багато харчових добавок, які містять поліфеноли, зокрема **ресвератол**, **куркумін** та EGCG. Саме ці три молекули захищають ДНК ліпіди білки від окислювального стресу, мають протизапальні властивості, покращують когнітивні здібності, використовуються для

лікування артриту, ожиріння діабету, а тому їх було визнано безпечними та рекомендовано у якості харчових добавок управлінням з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами Сполучених Штатів Америки (FDA). Цікаво, що куркумін має низьку біодоступність та діє шляхом санації кишківника і подальшого загоєння запалення. Ресвератол міститься у винограді, у червоному вині, а тому французи мають низьку схильність до серцево-судинних захворювань [1].

Основна властивість поліфенолів - це поглинання вільних радикалів, але оскільки вони також мають гідрофобні фрагменти, то можуть утворювати функціональні комплекси з мембранними білками, відповідальними за регуляцію метаболізму [2]. Механізм є основою корисних властивостей поліфенолів, але ефективність цих сполук пропорційна їх біодоступності, що включає всмоктування у кишківнику, метаболізм печінки, розподіл у тканинах та екскрецію. Більшість поліфенолів є глікозильованими, а тому погано всмоктуються у кишківнику, а спочатку піддаються деглікозилюванню перед всмоктуванням. EGCG абсорбується у кишківнику шляхом парацелюлярної дифузії через епітеліальні клітини без гідролізу. Флавоноїди можуть взаємодіяти з ABC-транспортерами у кишківнику, що може спричинити регулювання ступеня кишкового виведення та розподілу флавоноїдів у цільових ділянках тканин. У печінці кверцетин та EGCG метаболізується шляхом метилювання, сульфатування тощо. В цілому значна кількість метаболітів поліфенолів потрапляє у кровотік, зберігаючи біологічну активність та сильніші або слабші ефекти у порівнянні з вихідними сполуками. Катехіни зеленого чаю складають дуже високу частку плазми крові, бо вони не мають цукрового фрагмента і тому швидко абсорбується у тонкому кишківнику без жодних модифікацій [1].

Погана біодоступність ресвертолу не тільки впливає на механізм його дії, але і спричиняє різні ефекти *in vivo* та *in vitro*. Незважаючи на добру преоральну абсорбцію ресвератолу, він швидко біотрансформується шляхом глюкоралізації та сульфатування. Сульфати та глюкороніди ресвератолу через

АВС-транспортери (мембранні канали, що використовують енергію АТФ) можуть транспортуватися у кровоток, зв'язуватися з альбуміном або ліпопротеїнами і розподілятися по периферичних тканинах [1].

На відміну від ресвератолу, куркумін має низьку біодоступність, бо погано всмоктується у тонкому кишківнику, а також швидко виводиться з організму після метаболізації в ентероцитах та гепатоцитах а утворення дигідрокуркуміну гексагідрокуркуміну тощо, і як наслідок фізіологічно неактивних сполук. Мікробіом кишківника також бере участь у біотрансформації куркуміну шляхом деметилювання або сульфатування. метаболіти куркуміну часто зберігають фармакологічні властивості куркуміну, показуючи протизапальну антидіабетичну антиоксидантну протипухлинно та кардіопротекторну властивості [1].

Через низьку біодоступність поліфенолів важливою є проблема дизайну біосумісних нанопереносників для покращення біологічної ефективності та стабільності цих сполук.

## **РОЗДІЛ 1.2. ФУНКЦІОНАЛЬНІ БІЛКИ ЯК НАНОПЕРЕНОСНИКИ ДЛЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН**

Альбумін грає важливу роль в організмі людини, оскільки підтримує колоїдно-осмотичний тиск всередині судин та нейтралізує токсини. Також альбумін транспортує вітаміни, гормони, цинк і кальцій, має антиоксидантні властивості, бере участь у коагуляції [6].

Альбумін має високу біосумісність, здатність до біодеградації, низьку імунотоксичність, здатність до взаємодії з різними (гідрофобними та гідрофільними) малими лігандами, потенційно подовжуючи їх період циркуляції у плазмі крові, а також з рецепторами, які набагато сильніше експоновані у більшості хворих клітин, потенційно дозволяючи активне націлювання на джерело захворювання без додавання специфічних лігандів.

Час напіввиведення альбуміну з крові людини складає близько 19 днів, тому цей білок може продовжувати напівперіод життя та проводити цільову доставку ліків до мішені. Протипухлинні препарати на основі альбуміну, де альбумін є нанопереносником, зараз проходять клінічні випробування [6].

Прогрес у нанотехнології платформи для ефективного транспортування та цільової доставки лікарських речовин, зокрема слабо розчинних у воді ліків та ліків білкової природи до внутрішньоклітинних мішеней. Ліпідні та полімерні носії, які лежать в основі структури наночастинок, здатні ефективно контролювати розподіл та вивільнення лікарських речовин, а також, долати бар'єри на шляху їх доставки до ураженого місця. Однак деякі наночастинок здатні поглинатися фагоцитарними клітинами, викликати неспецифічну імунну реакцію, розподіляють лікарські речовини поза місцем цільової доставки тощо.

Крім зв'язування за допомогою нековалентних зв'язків, науковці також досліджували хімічне зв'язування різних лікарських препаратів та різноманітних лінкерів з наночастинками альбуміну, що дозволяло зробити функціоналізацію наночастинок.

Альбумін сироватки людини має 585 амінокислот, 67% яких утворюють  $\alpha$ -спіралі, 6 бета-поворотів і 17 дисульфідних містків, які зшивають три гомологічні домени. Цей білок є високомолекулярним та найбільш поширеним у крові людини (концентрація альбуміну у крові становить 3,5-5 г/дл), а виробляється він гепатоцитами печінки. До 60% білка знаходиться в інтерстиціальному просторі, а не у плазмі крові [6].

Вироблення альбуміну стимулюється тироксином, інсуліном, кортизолом, і пригнічується підвищеною концентрацією калія та осмотичним тиском в гепатоцитах. Погана адсорбція поживних речовин гальмує здатність гепатоцитів синтезувати альбумін. Розпад альбуміну проходить переважно в печінці та нирках. Недостатня кількість альбуміну в організмі може викликати коагулопатію.

Альбумін може зв'язуватися з ендогенними речовинами: катіонами, вітамінами, білірубіном, гормонами, жирними кислотами тощо, а також з екзогенними речовинами: антибіотиками, антикоагулянтами, препаратами

для серцево-судинної, нервової, ниркової систем, протизапальними та гіпоглікемічними засобами. При фізіологічному значенні рН альбумін має від'ємний заряд -17. Завдяки електростатичному притягуванню іонів натрію до альбуміну вода затягується у кровоносні судини та утримується всередині. При важких захворюваннях печінки (виробляє альбумін) та нирок (підтримує концентрацію альбуміну у крові) може проходити розрідження крові завдяки збільшенню її рідкої фракції [6].

У якості нанотранспортерів для поліфенолів часто використовують білки, які також дозволяють збільшити термін зберігання в поліфенолів. Саме завдяки нековалентній взаємодії поліфенолів з білками змінюються фізико-хімічні властивості комплексу та забезпечується стабільність поліфенолів. Ступінь взаємодії залежить від температури, рН, а також від структури молекул. підвищити стабільність можна за допомогою формування наноконкомплексів, моногідрогелів, наноемульсій білків з поліфенолами. У поєднанні з білками також використовують вуглеводи та ліпіди, причому отримані комплекси є дуже ефективними нанопереносниками для інкапсуляції поліфенолів [5].

Наявність декількох ОН-груп у структурі поліфенолів призводить до низької стійкості цих сполук до дії світла, температури та лугів, обмежуючи їх включення до харчових добавок. Комплекси білків з поліфенолами здатні підвищити хімічну та фізичну стабільність біоактивних сполук. Водневі зв'язки, які утворюють поліфеноли з білками, стабілізують структуру білків, причому білок-поліфенольні комплекси можуть мати модифіковану розчинність, термостабільність та засвоюваність організмом. Механізми взаємодії поліфенолів з білками є складними, тому незважаючи на велику кількість досліджень, для розвитку удосконалених нанопереносників поліфенолів необхідно вивчати всі механізми.

Одним із варіантів створення нанопереносників для поліфенолів є наноінкапсуляція, тобто захоплення цих сполук наночастинками меншими за розміром, ніж 1000 нм. Для виготовлення наноносіїв часто обирають біологічні полімери, безпечні та загальноновизнані, зокрема, білки, ліпіди та вуглеводи. серед інших, білки характеризуються легкістю у маніпуляціях та

біодеградацією, тому є перспективними матеріалами для інкапсуляції. Для створення наноносіїв для поліфенолів використовують емульгування, формування біополімерних комплексів та наногідрогелів з білком. Також було нещодавно показано, що завдяки взаємодії білків з поліфенолами стабілізується та посилюється здатність поліфенолів до захоплення активних форм кисню [5].

Білкові нанопереносники поліфенолів мають хорошу стабільність у крові, тому забезпечують тривале та контрольоване вивільнення поліфенолів. Також вони мають високу біосумісність, низьку вартість та високу біодеградацію. Завдяки наявності великої кількості функціональних груп на поверхні білків, вони можуть взаємодіяти з різною біоактивними сполуками, тому розвиток носіїв для фенолів на основі білків представляє винятковий інтерес.

Зазвичай поліфеноли взаємодіють з білками завдяки гідрофобним взаємодіям та водневим зв'язкам. Крім того, можуть формуватися слабші взаємодії, зокрема, ван дер Вальсові та іонні, і міцніші поодинокі ковалентні міжмолекулярні зв'язки. Амінокислоти тирозин триптофан та феніленін зазвичай взаємодіють шляхом гідрофобних контактів з поліфенолами. Також формуються водневі зв'язки ОН-груп поліфенолів з карбоксильною нітрогену чи кисню амінокислот. Під час утворення наночастинок білків, навантажених поліфенолами, спочатку різні фенольні сполуки взаємодіють з білками. На другому етапі з'являються димери білка, на яких сидять поліфеноли. На третьому етапі утворюються великі розчинні або нерозчинні агрегати білків з поліфенолами.

Багато досліджень взаємодії фенольних кислот з білками показали, що фенольні кислоти утворюють водневі зв'язки з C=O та C-N групами білка, що може спричинити перебудову внутрішньомолекулярного карбонільного водневого зв'язку білка. Нещодавно було показано, що галієва кислота зв'язується за допомогою водневих та в інтервальсових контактів з рисовим глютеліном, причому гідрофобність білка знижується при зростанні концентрації галієвої кислоти. Крім того, галова кислота викликала зниження вмісту альфа-спіральної структури та зростання вмісту бета-листів рисового



глютеліна. натомість, взаємодія кавової кислоти з альфа-лактоглобуліном та бета-лактоглобуліном призводили до зростання кількості бета-листів та зниження вмісту альфа-спіралей у цих білках [5].

Також було показано, що різні фенольні кислоти, зокрема саліцилова та галова, зв'язуються з різними сайтами зв'язування бета-казеїну.

Різні структури модифікації фенольних кислот можуть посилити їх спорідненість до білків. Зокрема, було показано, що осінність фенольних кислот до бета-лактоглобуліну покращується у випадку, коли метильна група була замісником у другому положенні замість гідроксильної [5].

Похідні стильбену, зокрема, ресвератол, який містить два бензольних кільця, сполучених етановим лінкером, зв'язувалися з альбуміном людини переважно за рахунок гідрофобних взаємодій. При цьому афігність похідних стильбену до альбуміну зростає при додаванні гідроксильної групи і спадає у результаті глікозилювання стильбеноїдів.

Для виготовлення нанопереносників поліфенолів використовують метод “згори до низу” та метод “знизу догори”. Метод “згори до низу” (зокрема, емульсифікація) передбачає використання спеціальних приладів, які можуть зменшити розмір та змінити форму наночастинок. Метод “знизу догори” (зокрема, коацервація) передбачає самозбірку біомолекул, яка регулюється температурою, концентрацією реагентів, рН та іонною силою.

Емульсія – це колоїдний розчин двох рідин, які не змішуються між собою, наприклад диспергована вода в олії або олія у воді. Натомість, наноемульсія характеризується меншими середніми радіусами крапель (50-500 нм). При зниженні розміру наночастинок збільшується стабільність емульсії. Організація та ультразвукове опромінення часто використовуються для отримання емульсії. Прикладом подвійної емульсії є вода в олії у воді (W1/O/W2) або олія у воді в олії (O1/W/O2). Подвійна емульсія W1/O/W2 містить краплі W1/O, які розташовані у безперервній водній фазі. Внутрішня водна фаза такої емульсії може переносити поліфеноли. Розміри крапель наноемульсії складають від 10 до 100 нм та містять рівномірно розподілений у воді шар емульгатора. Концентрація і тип емульгатора, в'язкість емульсії суттєво впливають на стабільність емульсії. Білок - це

перспективний емульгатор, який може покривати ліпідні наночастинки. Наприклад, Гаребегл та співавтори створили подвійні емульсії з пектину та сироваткового білка WPC для інкапсуляції поліфенолу, який виділено з листя оливи, досягаючи ефективності інкапсуляції 90% і розміру крапель 190 нм (рН 6). Для підвищення біодоступності куркуміну нещодавно розроблено наноемульсію на основі сироваткового білка WPC і на емульсію на основі альбуміну сироватки бика. Емульсія на основі альбуміну дозволила досягти 100% ефективності інкапсуляції та постійного повільного виділення куркуміну з наночастинок. Чиним, використання білка для створення наноемульсії дозволяють стабілізувати структуру поліфенолів включених у наноемульсії [5].

Інсулін людини грає важливу роль у рості клітин, гомеостазі глюкози, метаболізмі. Цей гормон має у складі 51 амінокислоту та виробляється  $\beta$ -клітинами підшлункової залози та, згідно з нещодавніми дослідженнями, деякими нейронами центральної нервової системи. Біосинтез інсуліну регулюється рівнем глюкози в крові наступним чином: для початку виділення інсуліну необхідна концентрація глюкози вища за 5 ммоль. Під час їжі зростає вироблення інсуліну  $\beta$ -клітинами та одночасно знижується вироблення глюкагону  $\alpha$ -літинами підшлункової залози. Після виділення інсулін приходить у гепатоцити, адипоцити та скелетні м'язи та змушує їх зберігати глюкозу у формі глікогену, знижуючи її у крові [7].

У плазматичній мембрані є інсулінові рецептори, які при зв'язуванні з інсуліном активують каталітичну функцію рецептору та, як наслідок, регулюють метаболічну активність інсуліну, експресію генів, що впливають на диференціацію клітин, та ріст клітин. Дефіцит інсуліну не дозволяє клітинам використовувати глюкозу у якості джерела енергії, що призводить до гіперглікемії та може призвести до цукрового діабету, пошкодження нервової системи та зниження функції очей і нирок. Також виникає залежність від жирових запасів у клітині як єдиного джерела енергії, що може спричинити кетоацидоз [7].

Нещодавні дослідження також показали, що інсулін послаблює запалення, зв'язані з остеопорозом, сприяє формуванню кісток, діє на

серце, шкіру та мозок. Метформін, який активує інсулінові рецептори, здатний захищати нирки від пошкодження, що було виявлено під час клінічних досліджень. Сульфонілсечовина збільшувала секрецію інсуліну завдяки своєму впливу на  $\beta$ -клітини підшлункової залози [7].

Інсулін людини рідко використовується як засіб для цілеспрямованої доставки лікарських речовин. Лише в одній нещодавній науковій статті показано, що інсулін людини має високий потенціал у якості доставки лікарських речовин для лікування респіраторних захворювань. Інгаляційний інсулін використовувався як допоміжний засіб, оскільки він допомагає підвищити ефективність та знизити токсичність лікарських речовин, які вводяться респіраторним шляхом [9].

Транзиторна гіперглікемія, або “діабет травми”, часто зустрічаються серед хворих відділення інтенсивної терапії, оскільки запальні реакції, викликані критичним захворюванням, індукують контррегуляторні шляхи та антагонізують інсулінорезистентність [8]. Існує висока кореляція між тяжкістю захворювання, ступенем гіперглікемії та смертністю у критично хворих. Висока концентрація глюкози викликає посилений оксидативний стрес та запалення багатьох органів. Тому пацієнтів відділення інтенсивної терапії, що мають гіперглікемію, часто лікують інсуліном. Метаболізм ліпідів, який порушено при цукровому діабеті та критичних захворюваннях, також реагує на лікування інсуліном, оскільки багато клітин експресують інсулінові рецептори. Інсулін впливає на синтазу оксиду азоту, що посилює синтез базальних рівнів оксиду азоту, що також призводить до васкулопротекторної дії при сепсисі та цукровому діабеті. Інсулін пригнічує транскрипцію генів NF- $\kappa$ B, які кодують медіатори запалення у мілоїдних запальних клітинах, надаючи протизапальний ефект. Також інсулін пригнічує роботу НАДФ-оксидази – основного генератора активних форм кисню під час запальних станів [8].

Отже, фармакологічні дози інсуліну знижують оксидативний стрес та запалення у здорових людей, людей з ожирінням завдяки зниженню рівня глюкози та вільних жирних кислот, а також – шляхом прямого інгібування НАДФ-оксидази.

Інвазивні щоденні ін'єкції інсуліну у хворих на діабет спонукають науковців розробляти нові стратегії доставки цього лікарського препарату до організму. інгаляційний інсулін швидко досягає системного кровообігу та здійснює свій лікувальний ефект, оскільки він представляє собою частинки невеликого розміру, які досягають альвеол та потрапляють в легеневі судини. Однак, тривале використання інгаляційного інсуліну призводить до легкого але стабільного порушення функції легень, а також збільшення захворювання на рак легень серед колишніх курців. Нещодавно розроблено інгаляційну форма інсуліну (AFRESA), яка зберігає нормальну функцію легень, є безпечною, оскільки в ній використовують мономерні інсуліну та Спеціальний метод приготування, який дозволяє збільшити ефективність доставки інсуліну до альвеол та капілярів [8]. Існує гіпотеза про те, що короткочасне лікування цим інгаляційним інсуліном гіперглікемічних пацієнтів може суттєво знизити запалення легень, контролювати глікемію та не шкодити довгострокові функції легень.

Зважаючи на протизапальні та протиглікемічні властивості інсуліну, раціональним виглядає дизайн нанопереносників лікарських речовин, зокрема поліфенолів, на основі інсуліну, що дозволить комбінувати протизапальні властивості інсуліну з антиоксидантними та протизапальним властивостями поліфенолів.

Поліфармакотерапія – сучасна стратегія лікування раку, діабету II типу, нейродегенеративних та метаболічних розладів, що включає два і більше фармпрепаратів, та часто застосовується у клінічній практиці. Важливим для політерапії є застосування лікарських речовин, які діють одночасно на кілька мішеней, для отримання корисних синергічних ефектів [10]. Поліфеноли також можуть бути використані у політерапії.

### **РОЗДІЛ 1.3. МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ**

Кожна молекула білка, ліганду, ДНК тощо характеризується кількістю атомів та їх зв'язків. Атоми характеризуються значеннями ван дер Ваальсових радіусів, а зв'язки між кожною парою атомів – довжиною

(відстанню між центрами двох атомів), кутом, обертальністю. Кількість ступеней свободи у молекули пропорційна до кількості обертальних зв'язків. Конформація молекули містить певні значення кутів в обертальних зв'язках (довжини зв'язків та кути змінюються мало і тому вважаються фіксованими). Рецептори мають 1000 – 2000 обертальних зв'язків, а ліганди – 3-15 і більше [20].

Молекулярний докінг – обчислювально складний процес молекулярного моделювання, метою якого є оцінка енергій та конформацій комплексів білка з лігандом, ДНК з лігандом, білка з ДНК, білка з білком тощо. Квантово-хімічні розрахунки та молекулярно-динамічне моделювання є альтернативою докінгу, бо дають більш точні результати. Але водночас вони використовують більше часу та комп'ютерних ресурсів, тому для розробки *in silico* прототипів нових лікарських речовин або для високопродуктивного *in silico* скринінгу потенційних лікарських речовин використовують саме молекулярний докінг [11]. Це прискорює створення нових ліків на основі структури (structure based drug design). Для докінгу важливим є геометричне моделювання зв'язування рецептора з лігандом (за принципом геометричної та хімічної компліментарності). Але найбільш важливою є правильна скорингова функція, яка використовуються для оцінки енергії комплексу, отриманого під час молекулярного докінгу. Така функція повинна бути селективною та ефективною, щоб розрізняти правильно і неправильно доковані структури та використовувати розумний (короткий) час для докінгу, відповідно. Більшість сучасних скорингових функцій базується на силових полях, тобто емпіричних підгонка до поверхні потенційної енергії, на якій існує білок. Силкові поля отримують створенням моделі, яка комбінує внесок зв'язаних (довжина зв'язку, кут, торсійний кут тощо) та незв'язаних термів (електростатичні та ван дер Ваальсові). Для різних типів атомів внесок кожного терму коригується у залежності від значень емпіричних параметрів.

Також існують статичні функції оцінювання, отримані шляхом використання експериментальних даних [20].

Існує багато програм для молекулярного докінгу. Зокрема, DOCK, AUTODOCK, SeamDock, ZDOCK, PatchDock, CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/index.php>), AutoDockVina та інші. Усі вони мають пошукові алгоритми, наприклад Genetic Algorithm, Монте-Карло тощо. За допомогою цих алгоритмів програма може знайти найкращу підгонку для двох або декількох молекул, зважаючи на параметри, отримані на основі геометричної компліментарності (значень ван дер Ваальсових радіусів атомів, зарядів, гнучкості молекулярної структури рецептора та ліганду), а також на основі аналізу міжатомних взаємодій (зокрема, гідрофобних, водневих). Отримані прогнозовані орієнтації (пози) ліганду у сайті зв'язування білка-мішені, причому матимемо декілька можливих конформацій комплексів рецептор-ліганд. Скорингові функції допомагають отримати найкращі орієнтації ліганду у сайті зв'язування на рецепторі після ранжировки комплексів за енергією зв'язування [21].

Алгоритми докінгу існують такі: **жорсткий докінг** (rigid-body docking) та гнучкий докінг (flexible docking). Перший алгоритм зосереджено виключно на пошуку геометричної компліментарності рецептора і ліганда, не змінюючи введені до програми конформації цих молекул. Наприклад, результати алгоритму ZDOCK виявили значення параметру  $RMSD < 1 \text{ \AA}$  (середньоквадратичне відхилення), при порівнянні результатів докінгу топоізомерази I людини з лігандом camptothecin (1RRJ) та кристалічної структури комплексу, отриманої експериментально [22]. Параметр RMSD розраховували для всіх атомів (N) кристалічної структури комплексу (координати  $x_c, y_c, z_c$ ) та найбільш енергетично вигідної (такої, що мала найнижче від'ємне значення скорингової функції) структури, отриманої за допомогою докінгу (координати  $x_d, y_d, z_d$ ) за такою формулою:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2]} \quad (1)$$

Варто зауважити, що у докінгових симуляціях ми очікуємо, що значення RMSD повинно бути нижчим за 1.5 Å.

Жорсткий докінг використовують для віртуального скринінгу великих баз (мільйонних баз) біоактивних малих лігандів, що можуть бути лікарськими речовинами. Отримані результати будуть більш точними, якщо використовувати емпіричні скорингові функції для оцінки енергій комплексів.

Гнучкий докінг (більш часозатратний) використовують для оптимізації сполуки-лідера, який знайдено за допомогою жорсткого докінгу. Сполука-лідер – прототип лікарської речовини, яка може бути ефективною, але тільки після певної модифікації, зокрема, додавання певних функціональних груп, що збільшать розчинність у воді, біодоступність, знизять токсичність тощо [23]. Гнучкий докінг бере до уваги декілька можливих конформацій кожної з взаємодіючих молекул окремо або двох одночасно, часто використовуючи методи fast shape matching (SM), Монте-Карло, генетичні алгоритми тощо.

Скорингові функції – це методи математичної підгонки для оцінки афінності зв'язування, що допомагають знайти ліганд з найвищою афінністю до рецептора. Їх точність можна валідувати за допомогою оцінки їх здатності виявити фальшиво позитивні результати докінгу, використовуючи підгонку ліганду, структура комплексу якого з рецептором уже була виявлена експериментально [24]. Також скорингова функція допомагає ідентифікувати раніше невідомі сайти зв'язування на білку, прогнозувати афінність білка до іншого білка тощо.

Використовуючи у якості вхідного файлу 3D-структуру бінарного комплексу рецептор-ліганд, скорингові функції допомагають визначити вільну енергію зв'язування та афінність ліганду до рецептора (константу зв'язування ліганду з рецептором). Енергію зв'язування розраховують за допомогою рівняння Гібса-Гельмгольца:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (2)$$

де  $\Delta G$  вільна енергія комплексоутворення,  $T$  – температура (К),  $\Delta H$  – ентальпія,  $\Delta S$  – ентропія. Також розраховують константу зв'язування ( $K_i$ ) на основі  $\Delta G$ :

$$\Delta G = -RT \ln K_i, \quad (3)$$

Також існують скоринкові функції, основані на силових полях, знаннях або емпіричні. Функції на основі силових полів використовують незв'язуючі терми класичних механічних силових полів. Функції на основі знань – мають статистичне підґрунтя, бо мають бази даних міжмолекулярних контактів, визначених експериментально. Емпіричні формули використовують декілька термів міжмолекулярних взаємодій, відкаліброваних за допомогою процедури лінійної регресії, де теоретичні значення підганяються так, щоб були найбільш подібними до експериментальних даних.

Протягом процедури молекулярного докінгу скорингові функції використовуються для оптимізації розташування ліганду (пошуку сайтів зв'язування). Після процедури докінгу вони також використовуються, але для ранжування лігандів за їх афінністю до рецепторів, що дозволяє прогнозувати цю афінність [21].



## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для молекулярно-докінового дослідження обрали HDOCK сервер (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), який застосовує спеціальний ієрархічний FFT-алгоритм жорсткого докінгу (тобто без зміни конформацій білка та ліганда) [25,26]. HDOCK – гібрид методу DOCK для дослідження білок-білкових та білок-ДНК взаємодій. HDOCK інтегрує звичайний жорсткий докінг з докінгом на основі темплейту (коли ми використовуємо шаблонний комплекс білок-білок (за допомогою методу рентгеноструктурного аналізу чи ядерного магнітного резонансу) для того, щоб прогнозувати структуру комплексу даного білка з новим, але якщо готового шаблону немає, то використовуємо звичайний жорсткий докінг мономерного білка з іншим білком) [27]. Шаблонний комплекс є експериментально визначеним, але гомологічним до досліджуваних білків, гомологічність визначається за допомогою подібності амінокислотних послідовностей, інтерфейсу тощо. Структуру дослідженого білок-білкового комплексу будують моделюванням комплексу з використанням гомологічного комплексу як шаблону. Пост-докінг проводиться за допомогою молекулярного моделювання отриманих структур в AMBER (протягом часового інтервалу в 1000 кроків) для додаткового уточнення отриманих структур. Якщо шаблонів немає, то проводиться моделювання кожного білка на основі його гомологічних мономерних структур за допомогою MODELLER [27]. Для комплексу білок-ліганд, імовірно, немає шаблонів (вони є на сервері тільки для білок-білкових комплексів, комплексів білок-ДНК), тому це звичайний жорсткий докінг.

Під час процедури докінгу “рецептор” (нативний білок) та “ліганд” (поліфенол) розташовуються на решітках (грідах) та проводиться сортування пропонуваного алгоритмом мод зв’язування ліганда з білком на основі їх енергії зв’язування, оціненої за допомогою методу компліментарності форми (власне оцінюється значення скорингової функції, яке пропорційне до енергії

зв'язування). Щоб отримати різні моди зв'язування, сервер фіксує одну молекулу, а друга приймає рівномірно розподілені значення орієнтації (в обертальному просторі Ейлера та у трансляційному просторі) всередині решітки.

Структури 7 поліфенолів (галової кислоти, фенольної кислоти (саліцилової кислоти), куркуміну (кет-форма та енольна форма), кверцетину, ресвератолу та сесаміну) нарисували у програмі MarvinSketch (v.18.10) (робили також Clean in 2D та Clean in 3D, щоб отримати одразу тривимірні структури молекул), а потім оптимізували отримані структури в Avogadro (версія 1.1.0).

Тривимірні структури білків було скачано з банку білкових молекул (<https://www.rcsb.org/>), використовуючи коди 1AO6 (human serum albumin, або альбумін людини, ALB) та 5ENA (human insulin, або інсулін людини, INS).

Слід зазначити також, що альбумін було релаксовано (мінімізовано енергію білка у воді, щоб впевнитись у тому, що молекула білка не має стеричних клешів та неправильної геометрії [28]) за допомогою GROMACS (програма для молекулярної динаміки) протягом 5 наносекунд (pH 7, 310 K, 0.15 M NaCl, кубічна решітка). Хоча процедура мінімізації енергії білка використовуються найчастіше у випадку, коли модифіковані амінокислотні залишки, бо тривимірна структура, визначена експериментально, є більш точною. Тобто краще було би взяти звичайну структуру білка, скачану з бази даних.

Молекулярний докінг білків з бінарними та потрійними комбінаціями поліфенолів проводили за такою схемою:

1) Докінг білка з галовою кислотою. Отриманий комплекс білка з одним поліфенолом (для кожного з двох білків) з найнижчим значенням скорингової функції (найбільш стабільний, бо енергія зв'язування має від'ємне за знаком значення), обирали у якості РЕЦЕПТОРА-1 для наступних етапів докінгу.

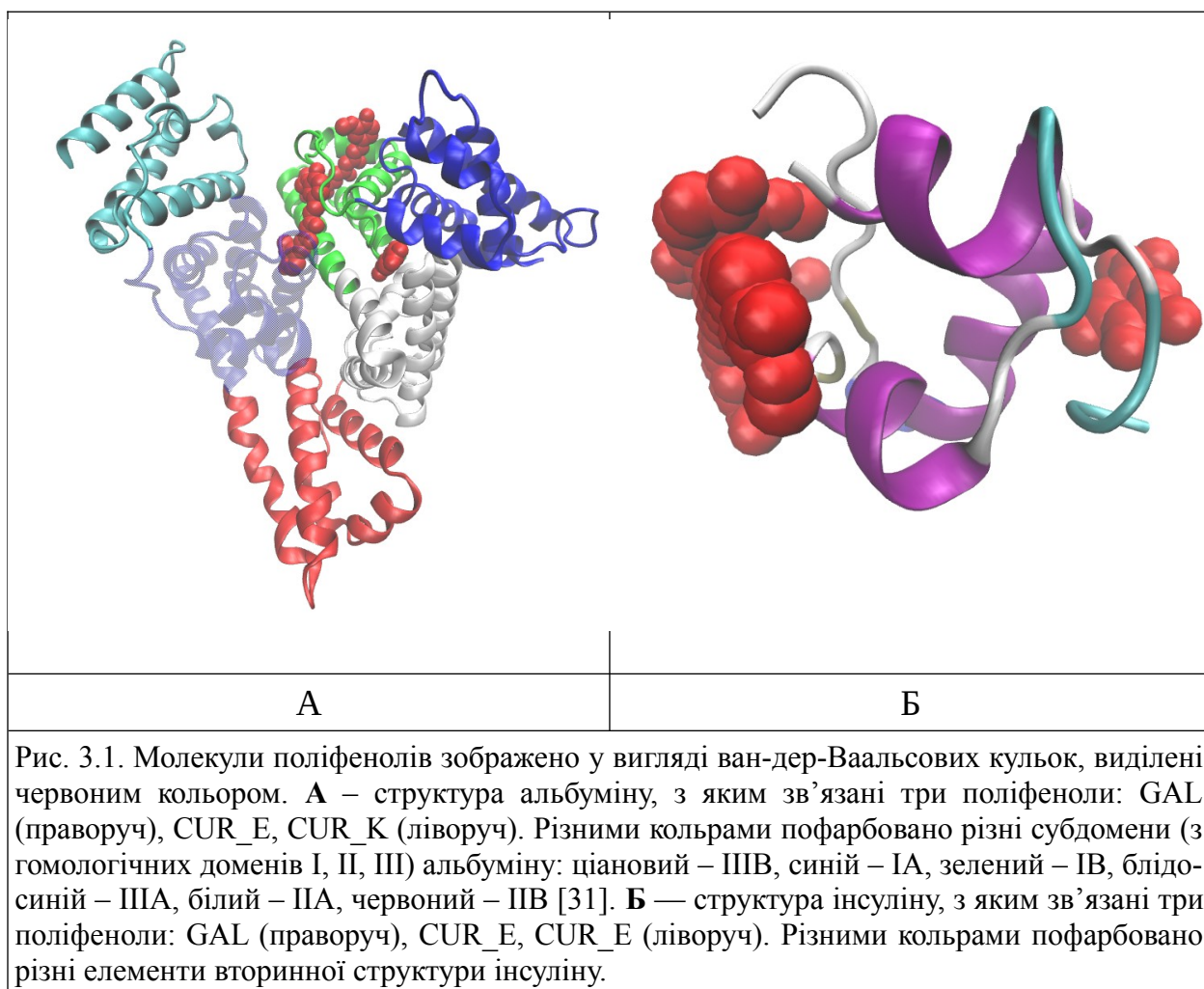
- 2) Докінг РЕЦЕПТОРА-1 з кожним з семи досліджуваних поліфенолів. Отримані 7 комплексів білка (для кожного з двох білків) з бінарними комбінаціями поліфенолів, де першим поліфенолом у ряду є галова кислота, а другим – кожен з 7 поліфенолів, з найнижчим значенням скорингової функції, обирали у якості РЕЦЕПТОРА2 для третього етапу докінгу.
- 3) Докінг РЕЦЕПТОРА2 з кожним з семи поліфенолів. Отримано 49 комплексів (для кожного з двох білків) білка з потрійними комбінаціями поліфенолів, де першим поліфенолом у ряду є галова кислота, а другим – кожен з 7 поліфенолів, третім – кожен з 7 поліфенолів, з найнижчим значенням скорингової функції.
- 4) Усі отримані комплекси:  $1 + 7 + 49 = 57$  для альбуміну та 57 для інсуліну проаналізували. Оцінювали значення енергії комплексів білків з потрійними комбінаціями поліфенолів, порівнювали зі значеннями енергії комплексів білків з бінарними комбінаціями поліфенолів та з одним поліфенолом (галовою кислотою). Також візуалізовували сайти зв'язування поліфенолів з білком за допомогою Discovery Studio (версія 24.1.0.23298) та UCSF Chimera (версія 1.17.3) [29].

Слід також зазначити, що вибір програми для докінгу спирався на принципову можливість робити швидкий (простий, жорсткий) докінг ДЕКІЛЬКОХ поліфенолів на одному білку. Бо інші сервери, наприклад, SeamDock, PatchDock такого не дозволяють., а AUTODOCK VINA (одна з найкращих програм для молекулярного докінгу) потребує більше часу та комп'ютерних ресурсів [30].

### РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ АЛЬБУМІНУ ТА ІНСУЛІНУ У ЯКОСТІ НАНОПЕРЕНОСНИКІВ ПОЛІФЕНОЛІВ

#### РОЗДІЛ 3.1. ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ КОМПЛЕКСІВ БІЛКІВ З ПОЛІФЕНОЛАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ

Прикладові комплекси білків з лігандами наведено на рисунку 3.1.



На рисунку 3А видно, що поліфеноли зв’язуються переважно з субдоменом ІВ, найближче до сайту зв’язування для гему, хоча ІА, ІІА, ІІА теж беруть участь у зв’язуванні (ближче до сайтів зв’язування для варфаріну і мирістейту) [32]. З рис. 3Б видно, що CUR\_E зв’язується в такому ж сайті інсуліну, як і попередній CUR\_E (другий у ряду).

Результати докінгу показали (Таблиця 1), що альбумін можна використовувати як нанопереносник для бінарних комбінацій: GAL+CUR\_E, GAL+CUR\_K, GAL+QUER, GAL+RES, GAL+SES, оскільки енергія комплексу знижується за абсолютним значенням при додаванні CUR\_E, CUR\_K, QUER, RES, SES до комплексу ALB+GAL.

Таблиця 2. Значення скорингової функції найбільш енергетично вигідних комплексів, отриманих у результаті докінгу **інсуліну** з галовою кислотою (GAL), а також бінарним і потрійними комбінаціями поліфенолів

| Система (S)                                       |            |            | INS+GAL |         |         |         |         |
|---------------------------------------------------|------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Енергія зв'язування, E (скорингова функція), в.о. |            |            | -79.77  |         |         |         |         |
| S                                                 | +<br>CUR_E | +<br>CUR_K | + GAL   | + PHEN  | + QUER  | + RES   | + SES   |
| E, в.о.                                           | -113.74    | -111.86    | -76.3   | -71.01  | -112.71 | -86.96  | -112.75 |
| S                                                 | E, в.о.    | E, в.о.    | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. |
| +<br>CUR_E                                        | -126.98    | -120.21    | -114.44 | -114.01 | -148.50 | -116.18 | -131.10 |
| +<br>CUR_K                                        | -128.34    | -118.23    | -129.07 | -122.17 | -137.0  | -117.70 | -128.96 |
| + GAL                                             | -91.49     | -81.10     | -72.7   | -72.65  | -96.77  | -76.33  | -84.03  |
| + PHEN                                            | -81.59     | -76.31     | -64.61  | -64.58  | -87.10  | -70.86  | -76.15  |
| +<br>QUER                                         | -126.45    | -120.35    | -112.95 | -112.67 | -148.63 | -112.63 | -121.05 |
| + RES                                             | -102.87    | -98.86     | -88.21  | -86.80  | -115.83 | -88.86  | -101.50 |
| + SES                                             | -126.19    | -127.85    | -112.92 | -112.77 | -138.13 | -117.52 | -129.11 |

Також цікаво, що альбумін можна використовувати як нанопереносник для потрійних комбінацій: GAL+CUR\_E+QUER, GAL+CUR\_E+SES, GAL+RES+CUR\_E, GAL+RES+CUR\_K, GAL+RES+QUER, GAL+RES+SES, оскільки при додаванні до бінарного комплексу альбуміну з поліфенолами GAL+CUR\_E, GAL+RES третього поліфенолу (QUER, SES – для двох

бінарних комплексів або CUR\_E, CUR\_K – тільки для комплексу GAL+RES), енергія комплексу зменшується за абсолютною величиною.

Також цікаво, що потрійні комплекси альбуміну з GAL+GAL+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+GAL+QUER, GAL+GAL+RES, GAL+GAL+SES; GAL+PHEN+CUR\_E, GAL+PHEN+CUR\_K, GAL+PHEN+QUER, GAL+PHEN+RES, GAL+PHEN+SES, мають нижчі значення енергії, ніж комплекс ALB+GAL, хоча вищі значення, ніж комплекси альбуміну з бінарними комбінаціями поліфенолів (без третього поліфенолу у ланцюгу). Ці результати, як і інші дані, свідчать про те, що додавання другої галової кислоти, а також – фенольної кислоти (подібної за структурою до галової) до комплексу ALB+GAL призводить до конкуренції між цими поліфенолами за сайти зв'язування на альбуміні та як наслідок – до зростання енергії комплексу за абсолютним значенням (послаблення стабільності комплексу). Додавання цих кислот у якості третіх до інших бінарних комплексів також збільшувало значення енергії комплексу, причому до значень, вищих, ніж енергія комплексу ALB+GAL (Таблиця 1).

Значення енергій комплексів, що містять потрійні комбінації поліфенолів, серед яких є друга GAL або PHEN, приблизно дорівнювали значенням енергії комплексів, що містять бінарні комбінації поліфенолів (без галової та фенольної кислот). В цілому, присутність у потрійних комбінаціях двох однакових поліфенолів знижувало стабільність комплексів відносно бінарних комбінацій (черх конкуренцію за сайти зв'язування на альбуміні), тобто додавання третього поліфенолу вже не було енергетично вигідним. RES, імовірно, конкурує з іншими поліфенолами (крім GAL, PHEN), тому його наявність у комплексах з потрійними комбінаціями поліфенолів (як 3 поліфенол), призводить до зниження стабільності комплексів.

Порядок додавання різних поліфенолів незначно впливав на сумарну енергію комплексу (енергія змінювалася на 4-5%), тобто різні за структурою поліфеноли майже не конкурують за сайти зв'язування на білку.

Судячи зі стабільності комплексів, альбумін буде найкращим переносником для таких комбінацій поліфенолів: GAL+CUR\_K, GAL+SES, GAL+GAL+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+GAL+SES, GAL+PHEN+CUR\_K, GAL+PHEN+SES, оскільки їх енергія знижується на 38 – 48% у порівнянні з комплексом PROTEIN+GAL (Таблиця 1). Тобто куркумін (кет-форма) і сезамін є найбільш оптимальною парою до галової кислоти (або до двох галових кислот чи галової і фенольної кислоти), які утворюють найбільш стійкі комплекси з альбуміном.

Таблиця 2. Значення скорингової функції найбільш енергетично вигідних комплексів, отриманих у результаті докінгу **інсуліну** з галовою кислотою (GAL), а також бінарним і потрійними комбінаціями поліфенолів

| Система (S)                                       |         |         |         | INS+GAL |         |         |         |
|---------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Енергія зв'язування, E (скорингова функція), в.о. |         |         |         | -79.77  |         |         |         |
| S                                                 | + CUR_E | + CUR_K | + GAL   | + PHEN  | + QUER  | + RES   | + SES   |
| E, в.о.                                           | -113.74 | -111.86 | -76.3   | -71.01  | -112.71 | -86.96  | -112.75 |
| S                                                 | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. | E, в.о. |
| + CUR_E                                           | -126.98 | -120.21 | -114.44 | -114.01 | -148.50 | -116.18 | -131.10 |
| + CUR_K                                           | -128.34 | -118.23 | -129.07 | -122.17 | -137.0  | -117.70 | -128.96 |
| + GAL                                             | -91.49  | -81.10  | -72.7   | -72.65  | -96.77  | -76.33  | -84.03  |
| + PHEN                                            | -81.59  | -76.31  | -64.61  | -64.58  | -87.10  | -70.86  | -76.15  |
| + QUER                                            | -126.45 | -120.35 | -112.95 | -112.67 | -148.63 | -112.63 | -121.05 |
| + RES                                             | -102.87 | -98.86  | -88.21  | -86.80  | -115.83 | -88.86  | -101.50 |
| + SES                                             | -126.19 | -127.85 | -112.92 | -112.77 | -138.13 | -117.52 | -129.11 |

З таблиць 1 і 2 видно, що зв'язування з альбуміном є більш енергетично вигідним для поліфенолів, ніж, з інсуліном, оскільки маємо нижчі значення скорингової функції у першому випадку для всіх типів комплексів. Але комплексів з потрійним комбінаціями поліфенолів чітко простежується тенденція до отримання найбільш стабільних комплексів у випадку наявності у якості останнього доданого до комплексу поліфенолу одного з цих поліфенолів: CUR\_E, CUR\_K, QUER, SES, у порівнянні з комплексами, де третім поліфенолом був один з цих: GAL, PHEN, RES (ці 3 мають нижчу

молекулярну масу, ніж інші, тому, мабуть, утворюють менше контактів з білками).

Так само як і у випадку з альбуміном, для комплексів інсуліну з потрійними комбінаціями поліфенолів наявність 2 галових кислот або галової та фенольної кислот знижують стабільність комплексів інколи навіть до значень, нижчих, ніж у комплексі INS+GAL (Таблиця 2). Наявність ресвератолу у комплексах інсуліну з потрійними комбінаціями поліфенолів змінювала стабільність комплексів на 1-10% у порівнянні з комплексами інсуліну з бінарними комбінаціями поліфенолів (без ресвератолу), тобто ресвератол, як і галова та фенольна кислоти, конкурує з сайтами зв'язування на білку інших поліфенолів.

Найбільш стабільні комплекси інсулін мав з такими комбінаціями поліфенолів: GAL+QUER+CUR\_E, GAL+QUER+QUER, GAL+QUER+SES, GAL+SES+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+SES+SES, оскільки їх енергія знижується на 61 – 85% у порівнянні з комплексом PROTEIN+GAL. Тобто інсулін є найкращим переносником для комбінацій галової кислоти з куркуміном (енольна форма), кверцетином і сезаміном. На відміну від альбуміну, який не є оптимальним нанопереносником кверцетину, інсулін може використовуватися як переносник цього поліфенолу. Цікаво, що додавання до комплексу INS+GAL двох однакових поліфенолів (крім GAL і PHEN), призводило до зростання стабільності комплексів (абсолютне значення енергії зв'язування знижувалося, Таблиця 2). Особливо сильно стабільність зросла при додаванні до комплексу INS+GAL двох молекул кверцетину (+22% відносно комплексу INS+GAL+QUER) або 2 молекул сезаміну (+22% відносно комплексу INS+GAL+SES). Тобто на відміну від альбуміну, більшість досліджених поліфенолів (крім GAL і PHEN) мають декілька сайтів зв'язування на інсуліні, а тому 2 молекула такого самого поліфенолу сприяє стабілізації комплексів (Таблиці 1, 2).

Порядок додавання поліфенолів під час докінгу певним чином впливав на результати. Зокрема, енергія комплексу INS+GAL+QUER+CUR\_E була на



17% нижчою, ніж енергія INS+GAL+QUR\_E+QUER. Так само енергія комплексів INS+GAL+QUER+QUR\_K, INS+GAL+QUER+SES була на 14% нижчою, ніж енергія INS+GAL+QUR\_K+QUER, INS+GAL+SES+QUER. Тобто додавання кверцетину важливе на другому, а не на третьому етапі докінгу, тоді він міцніше зв'язується з білком, займаючи сайт, за який конкурують інші поліфеноли.

Таким чином, результати роботи показали, що як альбумін, так і інсулін можна використовувати як нанопереносники бінарних і потрійних комплексів поліфенолів. Але альбумін, схоже, є більш специфічним до куркуміну (кетотформа) і сезаміну, тоді як інсулін – до куркуміну (енольна форма), кверцетину і сезаміну. Обидва білки мають низьку специфічність до галової та фенольної кислот (вищі значення енергії комплексів) та ресвератолу. Однак для альбуміну ALB+GAL+PHEN+CUR\_K, ALB+GAL+PHEN+SES, ALB+GAL+GAL+CUR\_E, ALB+GAL+GAL+CUR\_K, ALB+GAL+GAL+SES, INS+GAL+GAL+CUR\_K стабільність комплексів зростає на 40 – 60% у порівнянні з комплексом PROTEIN+GAL.

Нарешті, на відміну від альбуміну, додавання 2 однакових поліфенолів (крім GAL і PHEN) до комплексу інсуліну з галовою кислотою, призводить до стабілізації цих комплексів.

## РОЗДІЛ 3.2. АНАЛІЗ САЙТІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКІВ ДЛЯ ПОЛІФЕНОЛІВ НА ОСНОВІ ДАНИХ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ

На наступному етапі роботи досліджували сайти зв'язування поліфенолів на білках, що містили 1, 2 або 3 поліфеноли.

На рис. 3.2 показано прикладові 2D-діаграми, які згенеровано у DiscoveryStudio, де вхідним файлом був найбільш оптимальний за енергією комплекс білок-поліфеноли. Ці діаграми дозволяють якісно та кількісно охарактеризувати нековалентні міжмолекулярні взаємодії.

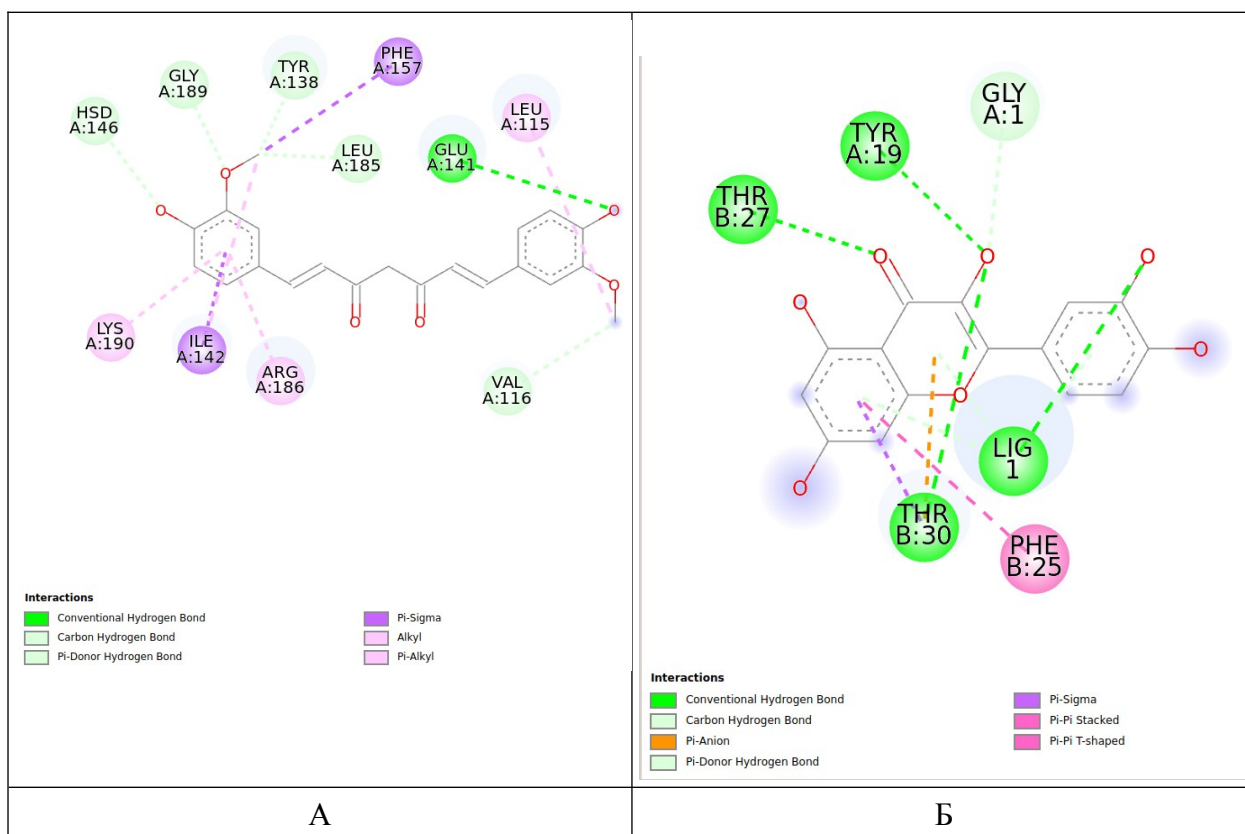


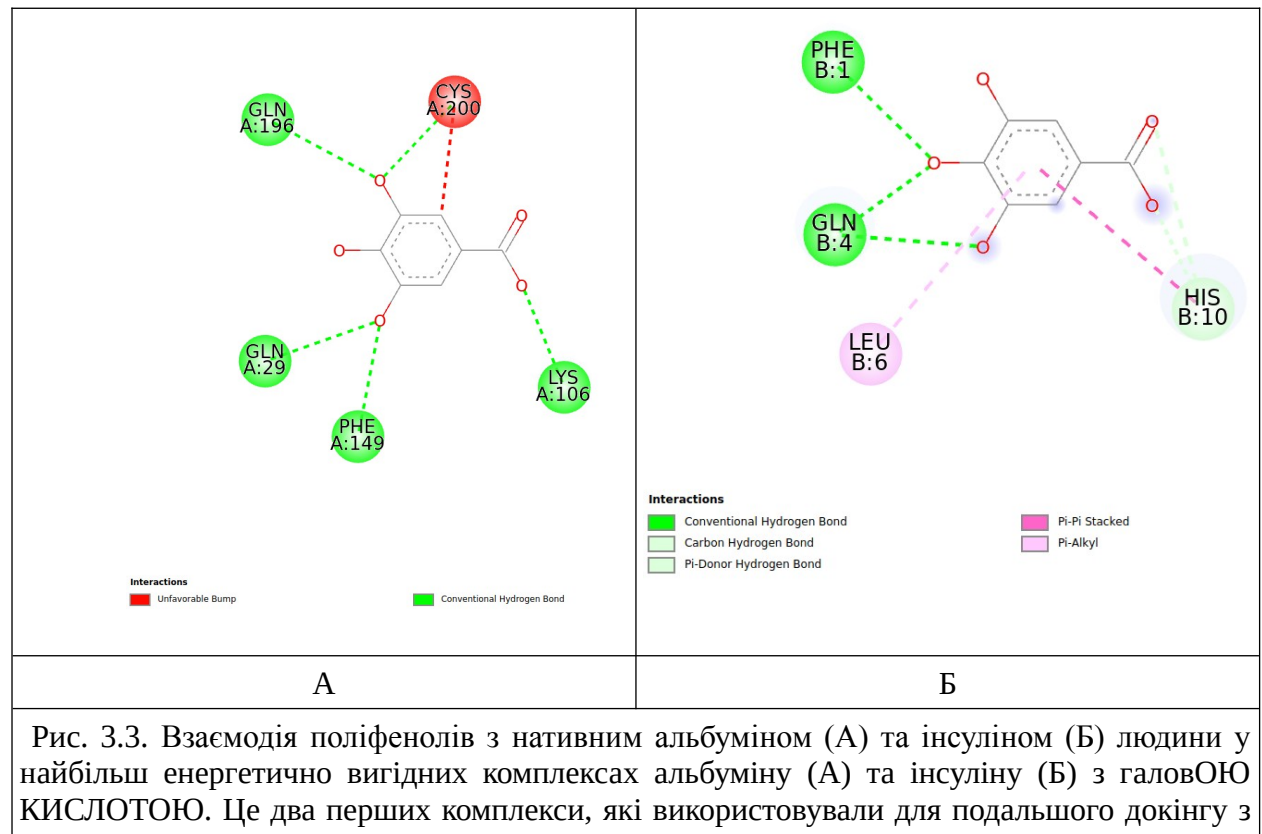
Рис. 3.2. Взаємодія потрійних комбінацій поліфенолів з нативним альбуміном (А) та інсуліном (Б) людини у найкращих за енергією докінгових комплексах ALB+GAL+GAL+CUR\_K (А) та INS+GAL+QUER+QUER (Б). На рисунку зображено тільки треті поліфеноли у ряду: CUR\_K (А) та QUER (Б). Зображення отримані у Discovery Studio. ОН-групи поліфенолів депротоновані під час формування зображення.

З рис. 3.2 видно, що третій у ряду поліфенол (CUR\_K) найбільш оптимального енергетичного комплексу альбуміну з потрійною комбінацією поліфенолів GAL+GAL+CUR\_K (значення скорингової функції комплексу = -184.01 в.о.) утворює водневі, карбонові водневі зв'язки з білком, а також — ароматичні (пі-сігма, пі-алкільні) і гідрофобні (алкільні) взаємодії. Крім того, саме комбінація GAL+GAL+CUR\_K + ALB є найбільш стабільною серед усіх 57 комплексів альбуміну з поліфенолами.

Також з рис. 3.2 видно, що третій у ряду поліфенол (QUER) найбільш оптимального енергетичного комплексу інсуліну з потрійною комбінацією поліфенолів GAL+QUER+QUER (значення скорингової функції комплексу = -148.63 в.о.) утворює водневі, карбонові водневі зв'язки з білком, а також —

ароматичні (пі-сігма, пі-пі взаємодії) взаємодії. Крім того, саме комбінація GAL+QUER+QUER + INS є найбільш стабільною серед усіх 57 комплексів інсуліну з поліфенолами.

На рис. 3.3 зображено комплекси альбуміну та інсуліну з галовою кислотою (**2D-діаграми**, які згенеровано у DiscoveryStudio, де вхідним файлом був найбільш оптимальний за енергією комплекс білок-поліфеноли). Енергії цих комплексів ALB+GAL та INS+GAL наведено у таблицях 1 і 2 . Видно, що галова кислота зв'язується з білками переважно за рахунок водневих зв'язків та з такими ж амінокислотами альбуміну, як було показано нами раніше методом молекулярного докінгу в HDOCK [33]. Це не дивно, бо вона є антиоксидантом, а наші дані також узгоджуються з результатами інших наукових досліджень [34]. Зокрема, раніше було показано, що антиоксидантна активність пропорційна до кількості ОН-груп у похідних фенолів, і галова кислота, що містить аж 4 ОН-групи, мала найвищу антиоксидантну активність серед багатьох поліфенолів [34].



метою отримання комплексів білків з бінарними та потрійними комбінаціями поліфенолів. Зображення отримані у Discovery Studio. ОН-групи поліфенолів депротоновані під час формування зображення.

На рис. 3.4 наведено типові комплекси білків з бінарними комбінаціями поліфенолів. Тут Discovery Studio не зміг побудувати 2D-діаграму, бо не відділив перший ліганд від другого (програма вміє робити 2D-діаграми для комплексу один білок : один ліганд, хоча у випадку комплексів один білок : три ліганди, Discovery Studio після примінення скрипту Find Ligand та функції Define Ligand залишив тільки третій доданий ліганд якимось дивом, та зміг побудувати 2D-діаграму зв'язування цього ліганду з білком). Тому на рис. 3.4 видно одразу і галову кислоту (перший поліфенол у ряду), і другий поліфенол у ряду (GAL — для ALB, QUER — для INS).

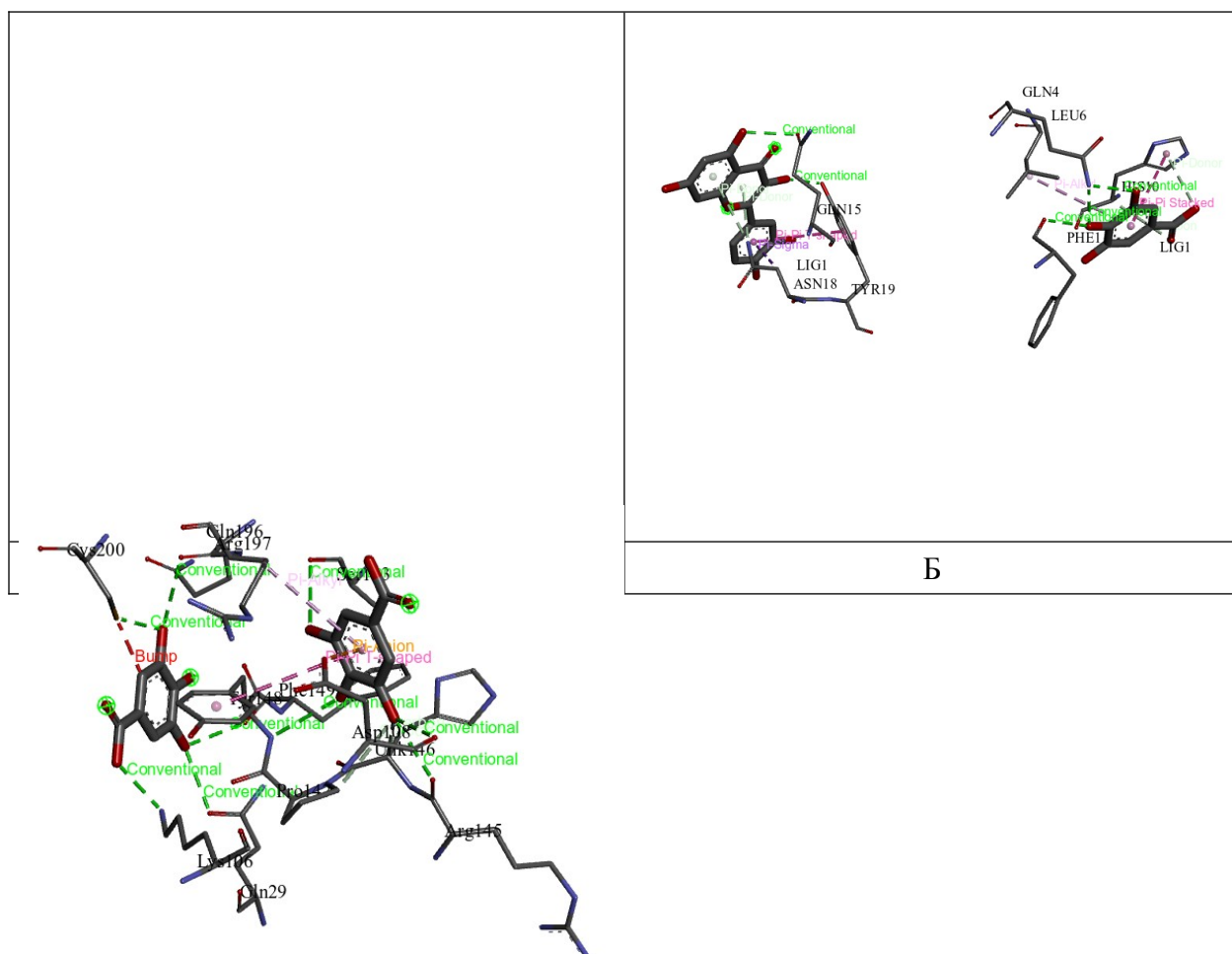


Рис. 3.4. Взаємодія потрійних комбінацій поліфенолів з нативним альбуміном (А) та інсуліном (Б) людини у найкращих за енергією докінгових комплексах ALB+GAL+GAL (А) та INS+GAL+QUER (Б). На рисунку зображено перший і другий поліфеноли у ряду: GAL, GAL (А) та GAL (праворуч), QUER (ліворуч) (Б). Це два комплекси, які використовували для подальшого докінгу з метою отримання комплексів білків з потрійними комбінаціями поліфенолів. На рисунку підписані тип нековалентних взаємодій білка з лігандами і назви та номери амінокислотних залишків. Зображення отримані у Discovery Studio. ОН-групи поліфенолів депротоновані під час формування зображення

**Увага:** усі результати, які обговорюються у цьому розділі, знаходяться у таблицях 3 та 4. Також проводиться порівняння енергій (скорингових функцій) комплексів білок-поліфеноли, значення яких можна знайти у таблицях 1 і 2 попереднього розділу.

В цілому, як і було виявлено у попередніх наших дослідженнях [33], поліфеноли зв'язувалися з білками за допомогою водневих (домінуючі типи зв'язків – для GAL, PHEN, RES, причому формуються сильні (звичайні) та слабкі (карбонові) водневі зв'язки), гідрофобних (алкільних) та ароматичних (пі-пі стекінг та пі-алкільних) зв'язків, але також були поодинокі електростатичні контакти (пі-аніонні та пі-катіонні зв'язки, пі-lone pair зв'язки).

Аналіз, проведений у Discovery Studio показав, що GAL (галова кислота) зв'язується з альбуміном (ALB) за допомогою водневих зв'язків. Альбумін має три субдомени (з гомологічних доменів I, II, III):

**IA** (залишки 5 – 107, сайт зв'язування для мирістейту),

**IB** (залишки 108 – 196, сайт зв'язування для гему),

**IIA** (залишки 197 – 297, сайт зв'язування для варфарину і мирістейту),

**IIB** (залишки 298 – 383, сайт зв'язування для ібупрофену),

**IIIA** (залишки 384 – 497, сайт зв'язування для ібупрофену),

**IIIB** (залишки 498 – 582, сайт зв'язування для мирістейту)

[31].

З таблиць 3 і 4 видно, що перший поліфенол, GAL, який обрали для докінгу з білками з метою отримання комплексу один білок: один поліфенол,

зв'язується з доменом І альбуміну. Додавання другого та третього поліфенолу до уже отриманого комплексу ALB+GAL, як правило, зовсім не призводило до конкуренції за той самий сайт зв'язування, що і у першого поліфенолу, за винятком комплексів з потрійними комбінаціями, де третім доданим поліфенолом був QUER, SES, CUR\_E, що в деяких випадках призводило до зв'язування цих третіх поліфенолів з амінокислотним залишком GLN196 (водневі зв'язки).

**Таблиця 3.** Аналіз сайтів зв'язування **альбуміну** з одинарними, подвійними та потрійним комбінаціями поліфенолів, отриманими за допомогою молекулярного докінгу

| Система (S)                     |                              |               |            | ALB+GAL                               |             |            |             |
|---------------------------------|------------------------------|---------------|------------|---------------------------------------|-------------|------------|-------------|
| А.к. залишки + типи зв'язків    |                              |               |            | GLN29, LYS106, PHE149, GLN196, CYS200 |             |            |             |
| водневі зв'язки в основному     |                              |               |            |                                       |             |            |             |
| S                               | + CUR_E                      | + CUR_K       | + GAL      | + PHEN                                | + QUER      | + RES      | + SES       |
| А.к. залишки +<br>типи зв'язків | Додатково:                   | Додат-        | Додатково: | Додатково:                            | Додатково:  | Додатково: | Додатково:  |
|                                 | LEU115,                      | ково:         | PHE140     | TYR401                                | ARG117,     | ARG117,    | ARG117,     |
|                                 | ARG117,                      | LEU115,       | TYR148     | GLN404                                | PRO118      | PHE134     | LYS137      |
|                                 | LYS137,                      | VAL116,       | SER193     | ARG428                                | MET123,     | TYR138     | TYR138      |
|                                 | TYR161,                      | TYR138,       | GLN196     | LYS519                                | PHE134      | GLU141     | TYR161      |
|                                 | LEU182,                      | GLU141,       | ASP108     | ILE523                                | LYS137      | LEU182     | LEU182      |
|                                 | ASP183,                      | ILE142,       | ARG145     | GLN526                                | TYR161      | ASP183     | ASP183      |
|                                 | ARG186                       | PHE157,       | водневі    | водневі                               | LEU182      | ARG186     | ARG186      |
|                                 | водневі                      | LEU185        | зв'язки в  | (жирним),                             | водневі     | водневі    | гідрофобрні |
|                                 | (жирним),                    | ARG186        | основному  | гідрофобрні                           | (жирним),   | зв'язки в  | і та        |
|                                 | гідрофобрні -                | GLY189        |            | та                                    | гідрофобрні | основному  | ароматичні  |
|                                 | решта                        | LYS190        |            | ароматичні                            | та          |            | - В         |
|                                 |                              | водневі       |            | - решта                               | ароматичні  |            | ОСНОВНОМ    |
|                                 |                              | (жирним),     |            |                                       | - решта     |            | у           |
|                                 |                              | гідрофобрні - |            |                                       |             |            |             |
|                                 |                              | решта         |            |                                       |             |            |             |
|                                 |                              |               |            |                                       |             |            |             |
|                                 |                              |               |            |                                       |             |            |             |
|                                 |                              |               |            |                                       |             |            |             |
|                                 |                              |               |            |                                       |             |            |             |
| S                               | А.к. залишки + типи зв'язків |               |            |                                       |             |            |             |
| +                               | Додатково:                   | Додатково     | Додатково: | Додатково:                            | Додатково:  | Додатково: | Додатково:  |
| CUR_E                           | PRO110                       | :             | PRO110     | LEU115                                | PRO110      | PRO110     | PRO110      |
|                                 | LEU115                       | PRO110        | LEU115     | ARG117                                | LEU115      | LEU115     | LEU115      |
|                                 | ARG145                       | LEU115        | ARG145     | LYS137                                | ARG145      | ARG145     | ARG145      |





|               |               |               |               |               |               |               |                  |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
|               |               | <b>PRO147</b> |               |               |               |               | <b>ASP183</b>    |
|               | <b>PHE189</b> | <b>TYR148</b> |               | <b>SER193</b> | <b>SER193</b> | водневі       | ARG186           |
|               | водневі       | <b>SER193</b> |               | ARG197        | ARG197        | (жирним),     | водневі          |
|               | (жирним),     | ARG197        | водневі       | водневі       | водневі       | гідрофобрн    | (жирним),        |
|               | гідрофобрні   | водневі       | (жирним) –    | (жирним) –    | (жирним) –    | і та          | гідрофобрн       |
|               | та            | (жирним)      | в             | в             | в             | ароматичні    | і та             |
|               | ароматичні -  | – в           | основному     | основному     | основному     | - решта       | ароматичні       |
|               | решта         | основном      |               |               |               |               | - решта          |
|               |               | у             |               |               |               |               |                  |
| <b>+ PHEN</b> |               |               |               |               |               |               | Додатково        |
|               | Додатково:    | Додатково     |               | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:    | :                |
|               | <b>TYR138</b> | <b>TYR401</b> | Додатково:    | <b>ASP108</b> | ILE142        | Додатково:    | <b>TYR138</b>    |
|               | ILE142        | <b>GLN404</b> | <b>TYR401</b> | <b>ARG145</b> | <b>ARG157</b> | ILE142        | ILE142           |
|               | <b>ARG157</b> | ARG428        | <b>GLN404</b> | <b>HIS146</b> | ARG186        | <b>ARG157</b> | <b>ARG157</b>    |
|               | GLY186        | <b>LYS519</b> | ARG428        | <b>PRO147</b> | <b>GLY189</b> | ARG186        | ARG186           |
|               | <b>PHE189</b> | <b>ILE523</b> | <b>LYS519</b> | <b>TYR148</b> | LYS190        | <b>GLY189</b> | <b>GLY189</b>    |
|               | водневі       | <b>GLN526</b> | <b>ILE523</b> | <b>SER193</b> | водневі       | водневі       | LYS190           |
|               | (жирним),     | водневі       | <b>GLN526</b> | ARG197        | (жирним),     | (жирним),     | водневі          |
|               | гідрофобрні   | (жирним)      | водневі       | водневі       | гідрофобрні   | гідрофобрн    | (жирним),        |
|               | та            | – в           | (жирним) –    | (жирним) –    | та            | і та          | гідрофобрн       |
|               | ароматичні -  | основном      | в             | в             | ароматичні    | ароматичні    | і та             |
|               | решта         | у             | основному     | основному     | - решта       | - решта       | ароматичні       |
|               |               |               |               |               |               |               | - решта          |
| <b>+ QUER</b> |               |               |               |               |               |               | Додатково        |
|               | Додатково:    | Додатково     | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:       |
|               | <b>SER192</b> | <b>SER192</b> | Додатково:    | ARG117        | <b>SER192</b> | <b>SER192</b> | <b>SER192</b>    |
|               | <b>LYS199</b> | <b>GLN196</b> | ARG117        | ARG117        | <b>GLN196</b> | <b>GLN196</b> | <b>GLN196</b>    |
|               | LEU238        | <b>LYS199</b> | PRO118        | PRO118        | <b>LYS199</b> | <b>LYS199</b> | <b>LYS199</b>    |
|               | <b>ALA291</b> | LEU238        | MET123        | MET123        | LEU238        | LEU238        | LEU238           |
|               | GLU292        | <b>ALA291</b> | PHE134        | PHE134        | <b>ALA291</b> | <b>ALA291</b> | <b>ALA291</b>    |
|               | водневі       | GLU292        | <b>TYR161</b> | <b>TYR161</b> | GLU292        | GLU292        | GLU292           |
|               | (жирним),     | водневі       | <b>LEU182</b> | водневі       | водневі       | водневі       | <b>водневі</b>   |
|               | гідрофобрні,  | (жирним),     | водневі       | (жирним),     | водневі       | (жирним),     | <b>(жирним),</b> |
|               | електростати  | гідрофобр     | (жирним),     | гідрофобрні   | (жирним),     | гідрофобрн    | <b>гідрофобр</b> |
|               | чні,          | ні,           | гідрофобрн    | ,             | гідрофобрні   | і,            | <b>ні,</b>       |
|               | ароматичні -  | електрост     | і,            | ароматичні    | ,             | електростат   | <b>електрост</b> |
|               | решта         | атичні,       | ароматичні    | -в            | електростат   | ичні          | <b>атичні</b>    |
|               |               | ароматичн     | - решта       | основному     | ичні          |               |                  |
|               |               | і - решта     |               |               |               |               |                  |
| <b>+ RES</b>  |               |               |               |               |               |               | Додатково:       |
|               | Додатково:    | Додатково     | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:    | Додатково:       |
|               | ASP108        | :             | <b>ARG117</b> | ARG117        | ASP108        | ASP108        | ASP108           |

|               |               |               |               |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               | ASP108        |               |               | HIS146        | HIS146        | <b>TYR148</b> |
| <b>TYR148</b> | HIS146        |               |               | <b>TYR148</b> | <b>TYR148</b> | ARG197        |
| ARG197        | <b>TYR148</b> |               | <b>PHE134</b> | ARG197        | ARG197        | <b>THR422</b> |
| <b>THR422</b> | ARG197        | <b>PHE134</b> | <b>TYR138</b> | <b>THR422</b> | <b>THR422</b> | GLU425        |
| GLU425        | <b>THR422</b> | <b>GLU141</b> | <b>GLU141</b> | GLU425        | GLU425        | <b>GLN459</b> |
| <b>GLN459</b> | GLU425        | <b>ASP183</b> | <b>LEU182</b> | <b>GLN459</b> | <b>GLN459</b> | водневі       |
| водневі       | <b>GLN459</b> | ARG186        | <b>ASP183</b> | водневі       | водневі       | (жирним),     |
| (жирним),     | водневі       | водневі       | <b>ARG186</b> | (жирним),     | (жирним),     | гідрофобрні   |
| гідрофобрні,  | (жирним),     | (жирним), -   | водневі       | гідрофобрні   | гідрофобрні   | і,            |
| електростати  | гідрофобрні,  | в             | (жирним), -   | ,             | і,            | електроста    |
| чні,          | ні,           | основному     | в             | електростат   | електростат   | тичні,        |
| ароматичні -  | електрост     |               | основному     | ичні,         | ичні,         | ароматичні    |
| решта         | атичні,       |               |               | ароматичні    | ароматичні    | - решта       |
|               | ароматичні    |               |               | - решта       | - решта       |               |
|               | і - решта     |               |               |               |               |               |
| <b>+ SES</b>  | Додатково     |               |               |               |               |               |
|               | :             |               |               |               |               |               |
| Додатково:    | <b>TYR150</b> |               |               | Додатково:    |               | Додатково:    |
| <b>TYR150</b> | <b>SER192</b> | Додатково:    |               | <b>TYR150</b> |               | <b>TYR150</b> |
| <b>SER192</b> | LYS195        | ARG117        | Додатково:    | <b>SER192</b> | Додатково:    | <b>SER192</b> |
| LYS195        | <b>GLN196</b> | LYS137        | LYS137        | LYS195        | <b>TYR150</b> | LYS195        |
| <b>GLN196</b> | LYS199        | <b>TYR138</b> | <b>TYR138</b> | <b>GLN196</b> | <b>SER192</b> | <b>GLN196</b> |
| PHE223        | LEU219        | <b>TYR161</b> | <b>TYR161</b> | LYS199        | LYS195        | LEU219        |
| LEU234        | LEU234        | LEU182        | LEU182        | LEU219        | LEU219        | LEU234        |
| LEU238        | LEU238        | <b>ASP183</b> | <b>ASP183</b> | PHE223        | LEU234        | LEU238        |
| HIS242        | HIS242        | ARG186        | ARG186        | LEU234        | LEU238        | LEU260        |
| LEU260        | LEU260        | водневі       | водневі       | LEU238        | LEU260        | ALA291        |
| ILE264        | ALA291        | (жирним), -   | (жирним), -   | LEU260        | ALA291        | водневі       |
| ALA291        | водневі       | гідрофобрні   | гідрофобрні   | ALA291        | водневі       | (жирним),     |
| водневі       | (жирним),     | і,            | ,             | водневі       | (жирним),     | гідрофобрні   |
| (жирним),     | гідрофобрні,  | ароматичні    | ароматичні    | (жирним),     | гідрофобрні   | і,            |
| гідрофобрні,  | ні,           | - решта       | - решта       | гідрофобрні   | і, ароматичні | ароматичні    |
| ароматичні -  | електрост     |               |               | , ароматичні  | і - решта     | - решта       |
| решта         | атичні,       |               |               | - решта       |               |               |
|               | ароматичні    |               |               |               |               |               |
|               | і - решта     |               |               |               |               |               |

У комплексах з бінарними комбінаціями ALB+GAL+інший поліфенол другий доданий поліфенол займав подібні місця для CUR\_E, QUER, RES, SES, і різні – для CUR\_K, GAL, PHEN. Оскільки GAL і PHEN дуже схожі за

молекулярною масою, є полярними та утворюють багато водневих зв'язків, то вони займають на білку інші місця, ніж інші поліфеноли. Комплекси ALB+GAL+PHEN, ALB+GAL+CUR\_E, ALB+GAL+CUR\_K, ALB+GAL+QUER, ALB+GAL+RES, ALB+GAL+SES сидять на субдомені IB (як гем), ALB+GAL+GAL – на домені III (зовсім інший сайт).

Схоже, що наявність вищої кількості водневих зв'язків GAL, PHEN, SES та їх відносно нижча молекулярна маса, призводять до нижчої стабільності комплексів ALB+GAL+GAL, ALB+GAL+PHEN, ALB+GAL+SES, ніж інших комплексів з бінарними комбінаціями поліфенолів.

Тепер розглянемо комплекси з потрійними комбінаціями поліфенолів.

Цікаво, що у випадку наявності у якості другого у ряду GAL, PHEN, третій доданий поліфенол з 7 досліджених (крім GAL, PHEN), як правило, займає інший сайт зв'язування субдомену IB альбуміну, ніж коли другим поліфенолом у ряду є CUR\_E, CUR\_K, QUER, RES, SES. При цьому цей окремий сайт має вищу спорідненість до поліфенолів, тому отримані комплекси мають на 10-17 % нижчі значення скорингової функції.

При додаванні до комплексів альбуміну з бінарним комбінаціями поліфенолів CUR\_E, цей поліфенол зв'язується переважно в одному й тому сайті зв'язування (сидить на субдомені IB), але переважна більшість амінокислотних залишків цього сайту відрізняється від сайту зв'язування другого поліфенолу у ряду (хоча там теж був субдомен IB). Варто зауважити, що тільки наявність PHEN у бінарній комбінації поліфенолів витісняє CUR\_E до сайту зв'язування, де формується більше водневих зв'язків (хоча там теж на субдомені IB). Таким чином, комплекси альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів, що містять GAL (1 у ряду) та CUR\_E – третій у ряду, мають різні сайти зв'язування (не конкурують між собою), хоча усі ці сайти знаходяться переважно на IB субдомені альбуміну.

Для випадку, коли третім поліфенолом у ряду є CUR\_K, так само, як і для CUR\_E, спостерігається зв'язування з однаковими амінокислотними

залишками субдомену IB білка, і тільки коли другий поліфенол у ряду – це GAL або PHEN – то CUR\_K займає окремий сайт зв'язування на субдомені IB.

Переважає більшість третіх у ряду поліфенолів зв'язується з субдоменом IB, хоча для комплексів ALB+GAL+GAL+GAL, ALB+GAL+CUR\_K+PHEN, ALB+GAL+GAL+PHEN, а також багато комплексів, що містять QUER, RES, SES у якості третіх поліфенолів у ряду, зв'язуються повністю або частково на III домені (сайт зв'язування для мирістейту та ібупрофену) та субдомені IIА (сайт зв'язування для варфаріну і мирістейту) альбуміну.

Цікаво, що енергія комплексів альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів, де третім поліфенолом у ряду є GAL або PHEN, була на 10-80% нижчою, ніж без додавання цього третього поліфенолу. Імовірно, це пов'язано з утворенням водневого зв'язку третього доданого поліфенолу з другим доданим поліфенолом, що спричиняє ослаблення взаємодії поліфенол-білок.

Також, варто зазначити, що комплекси з подвійними та потрійними комбінаціями поліфенолів мають інші сайти зв'язування, ніж комплекси альбуміну з одиничним поліфенолами (крім GAL, PHEN) (LEU115, ARG117, PRO118, MET123, PHE134, LYS137, TYR138, GLU141, TYR161, LEU182, ASP183, QRG186), що досліджені у нашій попередній роботі [33], але для комплексу ALB+GAL результати співпадають (правда, Discovery Studio має нижчі значення distance cutoff, ніж HDOCK – 5Å, тому він видає меншу кількість амінокислот, що взаємодіють з поліфенолами, а не всі амінокислоти на відстані 5Å від поліфенолу). У комплексах альбуміну з бінарними комбінаціями поліфенолів амінокислотні залишки, з якими зв'язані одинарні поліфеноли (крім GAL, PHEN) частково зберігаються такими, як і в попередній роботі. Відмінності з даними попередньої роботи також можуть бути пов'язані з використанням релаксованої структури альбуміну у нашій роботі.

**Таблиця 4.** Аналіз сайтів зв'язування **інсуліну** з одинарними, подвійними та потрійним комбінаціями поліфенолів, отриманими за допомогою молекулярного докінгу

| Система (S)                         |                                                                                                       |                                                                                          |                                                                                                                                                                                                         | INS+GAL                                                                                      |                                                                                                          |                                                                                                   |                                                                                              |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| А.к. залишки + типи зв'язків        |                                                                                                       |                                                                                          |                                                                                                                                                                                                         | PHE1B, GLN4B, LEU6B, HIS10B<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта              |                                                                                                          |                                                                                                   |                                                                                              |
| S                                   | + CUR_E                                                                                               | + CUR_K                                                                                  | + GAL                                                                                                                                                                                                   | + PHEN                                                                                       | + QUER                                                                                                   | + RES                                                                                             | + SES                                                                                        |
| <b>А.к. залишки + типи зв'язків</b> | Додатково:<br>TYR14A<br>ASN21A<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта                    | Додатково:<br>PHE1B<br>GLN4B<br>LEU6B<br>HIS10<br>В водневі (жирним), ароматичні - решта | Такі самі сайти, як і у першого ліганда.<br>PHE1B, GLN4B, LEU6B, HIS10B<br>Але перший ліганд тепер має тільки GLN4B, HIS5B і водневий з 2 лігандом.<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта | Додатково:<br>GLN4B,<br>CYS7B,<br>HIS10B<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта | Додатково:<br>GLN15A<br>ASN18A<br>TYR19A<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта             | Додатково:<br>ASN18A<br>TYR19A<br>водневі (жирним), ароматичні - решта                            | Додатково:<br>ASN18A<br>TYR19A<br>PHE25B<br>водневі (жирним), гідрофобні, ароматичні - решта |
| <b>S</b>                            | <b>А.к. залишки + типи зв'язків</b>                                                                   |                                                                                          |                                                                                                                                                                                                         |                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                   |                                                                                              |
| <b>+ CUR_E</b>                      | Додатково:<br>ароматичні з першим лігандом.<br>GLY1A<br>ILE2A<br>TYR19A<br>PHE24B<br>PHE25B<br>THR27B | Додатково:<br>ASN3B<br>водневі (жирним) - в основному у з 1 LIGAND                       | Додатково:<br>PHE1B<br>HIS10B<br>- електростатичні, гідрофобні, ароматичні + з 1 LIGANDOM<br>H-bonds                                                                                                    | Додатково:<br>TYR14A<br>ASN21A<br>водневі (жирним), решта - гідрофобні, ароматичні           | Додатково:<br>GLY1A<br>THR27B<br>водневі (жирним), - в основному + з 1 LIGANDOM<br>LIGANDOM<br>M H-bonds | Додатково:<br>PHE25B<br>WdW,<br>HYDROPHOBIC - в основному + з 1 LIGANDOM<br>M WdW,<br>HYDROPHOBIC | <b>НЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З БІЛКОМ. + z 1 LIGANDOM</b>                                               |

|             |                                                                                                                   |                      |              |             |             |               |               |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
|             | THR30B<br>водневі<br>(жирним),<br>гідрофобрні,<br>ароматичні –<br>решта<br>куркумін к<br>витісняє<br>інші ліганди | OM pi-pi<br>stacking |              |             |             | OBIC          |               |
| +           |                                                                                                                   |                      |              | Додатково:  |             |               | Додатково:    |
| <b>CUR_</b> |                                                                                                                   | Додатков             | Додатково:   | CYS7B       | Додатково:  |               | Додатково:    |
| <b>K</b>    | Додатково:                                                                                                        | о:                   | GLN4B        | HIS10B      | GLY1A       | Додатково:    | :             |
|             | TYR14A                                                                                                            | HIS10B               | CYS7B        | водневі     | GLN5A       | <b>ASN3B</b>  | <b>TYR14A</b> |
|             | GLN15A                                                                                                            | водневі              | SER9B        | (жирним) ,  | водневі     | водневі       | <b>ASN18A</b> |
|             | ASN18A                                                                                                            | (жирним)             | HIS10B       | решта -     | (жирним) ,- | (жирним) ,-   | <b>THR30B</b> |
|             | водневі                                                                                                           | – в                  | - водневі    | гідрофобні, | в           | в             | водневі       |
|             | (жирним) –                                                                                                        | основном             | (жирним),    | ароматичні  | основному   | основному     | (жирним) –    |
|             | в основному                                                                                                       | у                    | гідрофобні,  | +           | +           | +             | в             |
|             | + wDw Z                                                                                                           | +                    | ароматичні   | z 1         | z 1         | z 1           | основному     |
|             | LIGANDOM                                                                                                          | z 1                  | +            | LIGANDO     | LIGANDO     | LIGANDO       | +             |
|             | 1                                                                                                                 | LIGAND               | z 1 LIGANDOM | M           | M H-bonds   | M WdW ,       | WdW+hydr      |
|             |                                                                                                                   | OM pi-pi             | H-bonds      | гідрофобні, | ,           | hydrophobic   | ophobic Z     |
|             |                                                                                                                   | stacking             |              | ароматичні  | hydrophobic |               | LIGANDO       |
|             |                                                                                                                   |                      |              |             |             |               | M 1           |
| +           |                                                                                                                   |                      |              |             |             |               | Додатково:    |
| <b>GAL</b>  |                                                                                                                   | Додатков             |              |             | Додатково:  | Додатково:    | <b>ILE2A</b>  |
|             |                                                                                                                   | о:                   |              |             | THR27B      | <b>GLN4B</b>  | <b>TYR19A</b> |
|             |                                                                                                                   | PHE1B                | Додатково:   | Додатково:  | THR30B      | HIS5B         | <b>THR27B</b> |
|             | Додатково:                                                                                                        | GLN4B                | GLY1A        | GLY1A       | водневі     | <b>CYS7B</b>  | THR30B        |
|             | THR27B                                                                                                            | водневі              | GLN5A        | GLN5A       | (жирним) –  | <b>HIS10B</b> | водневі       |
|             | THR30B                                                                                                            | (жирним)             | GLN15A       | GLN15A      | в           | - водневі     | (жирним) –    |
|             | водневі                                                                                                           | – в                  | ASN18A       | ASN18A      | основному,  | (жирним) –    | в             |
|             | (жирним) –                                                                                                        | основном             | TYR19A       | TYR19A      | THR30 –     | в             | основному,    |
|             | в основному                                                                                                       | у                    | - водневі    | - водневі   | також       | основному,    | решта -       |
|             | + H-bonds Z                                                                                                       | +                    | (жирним) – в | (жирним) –  | електростат | решта –       | електроста    |
|             | LIGANDOM                                                                                                          | z 1                  | основному    | в           | ичні        | ароматичні,   | тичні         |
|             | 1                                                                                                                 | LIGAND               |              | основному   | + H-bonds Z | + H-bonds     | + H-bonds i   |
|             |                                                                                                                   | OM H-                |              |             | LIGANDO     | Z             | ароматичні    |
|             |                                                                                                                   | bonds I              |              |             | M 1         | LIGANDO       | Z             |
|             |                                                                                                                   | WdW                  |              |             |             | M 1           | LIGANDO       |
|             |                                                                                                                   |                      |              |             |             |               | M 1           |

|             |            |            |              |             |             |               |               |
|-------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| +           |            |            |              |             |             |               |               |
| <b>PHEN</b> |            |            |              |             |             |               |               |
|             |            | Додатков   |              |             | Додатково:  |               | Додатково:    |
|             |            | o:         |              |             | GLY1A       |               | GLY1A         |
|             |            | PHE1B      |              |             | ILE2A       |               | <b>ILE2A</b>  |
|             | Додатково: | GLN4B      |              |             | TYR19A      | Додатково:    | <b>THR27B</b> |
| GLY1A       |            | водневі    | Додатково:   | Додатково:  | THR27B      | <b>GLN4B</b>  | THR30B        |
| TYR19A      |            | (жирним)   | GLY1A        | GLY1A       | - водневі   | <b>CYS7B</b>  | - водневі     |
| THR27B      |            | ,          | TYR19A       | TYR19A      | (жирним) –  | - водневі     | (жирним) –    |
| THR30B      |            | WdW+ele    | THR27B       | THR27B      | в           | (жирним) –    | в             |
| водневі     |            | ctrostat - | - водневі    | - водневі   | основному,  | в             | основному,    |
| (жирним) –  |            | решта      | (жирним) – в | (жирним) –  | THR30 –     | основному     | решта -       |
| в основному |            | +          | основному    | в           | також       | +             | електроста    |
| + H-bonds Z |            | z 1        |              | основному   | електростат | z 1           | тичні         |
| LIGANDOM    |            | LIGAND     |              |             | ичні        | LIGANDO       | +             |
| 1           |            | OM H-      |              |             | +           | M H-bonds     | z 1           |
|             |            | bonds I    |              |             | z 1         |               | LIGANDO       |
|             |            | WdW        |              |             | LIGANDO     |               | M             |
|             |            |            |              |             | M H-bonds   |               | ароматичні    |
|             |            |            |              |             |             |               | та            |
|             |            |            |              |             |             |               | гідрофобні    |
|             |            |            |              |             |             |               |               |
| +           |            |            |              |             |             |               |               |
| <b>QUE</b>  |            |            |              |             |             |               |               |
|             | Додатково: | Додатков   | Додатково:   | Додатково:  | Додатково:  | Додатково:    | Додатково:    |
|             | GLY1A      | o:         | GLN15A       | GLN15A      | GLY1A       | <b>ASN18A</b> | <b>GLN5A</b>  |
|             | TYR19A     | PHE1B      | ASN18A       | ASN18A      | TYR19A      | CYS20A        | <b>TYR19A</b> |
|             | PHE25B     | ASN3B      | TYR19A       | TYR19A      | PHE25B      | <b>ARG22B</b> | THR30B        |
|             | THR27B     | GLN4B      | - водневі    | - водневі   | THR27B      | - водневі     | - водневі     |
|             | THR30B     | водневі    | (жирним) – в | (жирним) –  | THR30B      | (жирним) –    | (жирним) –    |
|             | водневі    | (жирним)   | основному    | в основно   | - водневі   | в             | в             |
|             | (жирним) – | ,          |              | також       | (жирним) –  | основному     | основному,    |
| в основному |            | WdW+ele    |              | електростат | в           | , решта –     | решта -       |
| + WdW Z     |            | ctrostat - |              | ичні, -     | основному,  | ароматичні    | електроста    |
| LIGANDOM    |            | решта      |              | решта –     | THR30 B –   | та            | тичні         |
| 1           |            | +          |              | WdW         | також       | гідрофобні,   | +             |
|             |            | z 1        |              |             | електростат | + z 1         | z 1           |
|             |            | LIGAND     |              |             | ичні,       | LIGANDO       | LIGANDO       |
|             |            | OM H-      |              |             | решта –     | M H-bonds     | M H-bonds     |
|             |            | bonds I    |              |             | ароматичні  |               | i             |
|             |            | WdW        |              |             | + z 1       |               | ароматичні    |
|             |            |            |              |             | LIGANDO     |               |               |





Аналіз, проведений у Discovery Studio показав, що GAL (галола кислота) зв'язується з інсуліном (INS) за допомогою переважно водневих, а також (на відміну від зв'язування з альбуміном) гідрофобних та гідрофобних (алкільних) і ароматичних (пі-пі та пі-алкільних) зв'язків. Видно, що перший поліфенол, GAL, який обрали для докінгу з білками з метою отримання комплексу один білок: один поліфенол, зв'язується з сайтом на N-кінці ланцюга В інсуліну.

Додавання другого та третього поліфенолу до уже отриманого комплексу INS+GAL, як правило, не призводило до сильної конкуренції за той самий сайт зв'язування, що і у першого поліфенолу, однак оскільки інсулін має низьку молекулярну масу у порівнянні з альбуміном, то конкуренція була вищою, ніж для альбуміну. Так, для комплексів з потрійними комбінаціями, де третім доданим поліфенолом був будь-який, крім SES, у деяких випадках призводило до зв'язування цих третіх поліфенолів з амінокислотними залишками PHE1B, GLN4B, HIS10B (водневі, гідрофобні, ароматичні зв'язки). Також, подвійні і потрійні комбінації, що містили одну або дві молекули, відповідно, поліфенолів CUR\_E, CUR\_K, GAL, у найвищому ступені конкурували з першим поліфенолом GAL, оскільки кожна з цих молекул зв'язувалася з 2 – 4 амінокислотними залишками центру зв'язування GAL. Це може свідчити про меншу здатність інсуліну бути переносником бінарних і потрійних комбінацій, що містять GAL та по одній-дві молекули, відповідно, CUR\_E, CUR\_K, GAL.

У комплексах з бінарними комбінаціями INS+GAL+інший поліфенол другий доданий поліфенол займав подібні місця (ближче до C-кінця ланцюга А) для QUER, RES, SES (як і для альбуміну!), і різні – для CUR\_E, CUR\_K, GAL, PHEN. Тобто для обох білків додавання другого поліфенолу QUER, RES або SES до комплексу з GAL призводить до локалізації цих других поліфенолів у подібних сайтах на білку. Оскільки GAL і PHEN дуже схожі за молекулярною масою, є полярними та утворюють багато водневих зв'язків,

то вони займають на білку інші місця, ніж інші поліфеноли. Комплекси ALB+GAL+GAL, ALB+GAL+PHEN, ALB+GAL+CUR\_K сидять на подібних сайтах ланцюга В інсуліну, комплекси ALB+GAL+QUER, ALB+GAL+RES, ALB+GAL+SES, INS+GAL+CUR\_E – на ланцюгу А інсуліну. Додавання другої молекули GAL до комплексу INS+GAL призвело до утворення водневого зв'язку між двома молекулами GAL.

Схоже, що наявність зв'язків з 3 амінокислотними залишками для комплексів INS+GAL+QUER, INS+GAL+SES надає на 30% більшої стабільності комплексам, у порівнянні з INS+GAL+RES, який має подібний сайт зв'язування, але зв'язує тільки 2 амінокислоти. Натомість, велика конкуренція за однакові сайти зв'язування з першим поліфенолом GAL у GAL і PHEN для комплексів INS+GAL+GAL, INS+GAL+PHEN призводить до вищих значень скорингової функції у порівнянні з комплексом INS+GAL, незважаючи на вищу кількість зв'язаних амінокислотних залишків, оскільки послаблюються зв'язки з білком обох молекул з бінарних комбінацій поліфенолів.

Тепер розглянемо комплекси з потрійними комбінаціями поліфенолів.

При додаванні до комплексів інсуліну з бінарним комбінаціями поліфенолів CUR\_E, цей поліфенол зв'язується добре (з ланцюгами А і В білка одночасно) тільки якщо другий поліфенол у ряду – також CUR\_E. В інших випадках місця для нього залишилось мало і тому навіть формуються водневі, ароматичні та гідрофобні зв'язки з другим куркуміном у ряду. Зокрема, для INS+GAL+SES+CUR\_E третій поліфенол у ряду – CUR\_E – взагалі не зв'язується з білком, а тільки з поліфенолом SES, хоча при цьому можуть утворитися ван дер Ваальсові зв'язки, а за рахунок зв'язування з другим поліфенолом у ряду стабільність комплексу зростає відносно стабільності комплексу INS+GAL+SES. Високою конкуренцією поліфенолів за сайти зв'язування з інсуліном можна пояснити нижчу стабільність комплексів інсуліну з поліфенолами, ніж альбуміну з поліфенолами.

Для випадку, коли третім поліфенолом у ряду є CUR\_K, так само, як і для CUR\_E, спостерігається зв'язування з другим лігандом у ряду, а також – низька кількість амінокислот білка, що зв'язуються з CUR\_K.

У випадку, коли другим поліфенолом у ряду є QUER, отримуємо до 17% стабільніші комплекси з потрійними комбінаціям поліфенолів (крім присутності у якості третіх поліфенолів у ряду GAL, PHEN), ніж для випадку, коли другим поліфенолом у ряду не є QUER.

Переважає більшість третіх у ряду поліфенолів зв'язується з другим у ряду поліфенолом за допомогою водневих, ароматичних та гідрофобних взаємодій. RES і SES не зв'язується з інсуліном взагалі у комплексах INS+GAL+PHEN+RES і INS+GAL+CUR\_K+SES, відповідно, хоча SES у другому комплексі взаємодіє з CUR\_K. Так само, для INS+GAL+SES+CUR\_E третій поліфенол у ряду – CUR\_E – взагалі не зв'язується з білком, а тільки з поліфенолом SES. Кількість зв'язаних амінокислот інсуліну третім поліфенолом у ряду є нижчою, ніж для альбуміну, що може пояснити нижчу стабільність комплексів інсуліну з потрійними комбінаціями поліфенолів, ніж таких самих комплексів альбуміну (таблиці 1, 2). Найстабільнішим є комплекс INS+GAL+QUER+QUER, у якому третій QUER у ряду утворює найвищу кількість зв'язків (5, з них 4 водневих) з інсуліном, і 1 водневий зв'язок з другим QUER у ряду.

Підсумовуючи результати Розділу 3.2, можна зробити такі висновки: Перший, другий поліфеноли та більшість третіх поліфенолів у ряду зв'язуються з субдоменом ІВ (як гем) альбуміну, а деякі треті у ряду поліфеноли – повністю або частково на **ІІІ домені** (сайт зв'язування для мирістейту та ібупрофену) та **субдомені ІА** (сайт зв'язування для варфаріну і мирістейту) альбуміну, причому амінокислотні залишки білка, з якими зв'язаний кожний поліфенол, як правило, різні. Поліфеноли на інсуліні зв'язувалися як з А, так і з В-ланцюгом білка. Цікаво, що незважаючи на використання у даній роботі релаксованого альбуміну, амінокислотні залишки зв'язування GAL з альбуміном у комплексі білка з одним

поліфенолом були однаковими у даній і в попередній роботі, де брали нерелаксований білок [33].

При додаванні до альбуміну та інсуліну двох і більше однакових поліфенолів стабільність комплексу, як правило, не зростає у порівнянні зі стабільністю комплексу “білок-один поліфенол” через високу конкуренцію за однакові сайти зв’язування. При цьому у випадку наявності галової та фенольної кислот у якості третього поліфенолу у ряду, стабільність комплексів альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів падає на 10-80% через формування водневих зв’язків між третім та другим поліфенолом у ряду. Однак, при додаванні цих кислот як других у ряду, стабільність комплексів альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів зростає на 10-17%, імовірно, через те, що вони не заважають через свою низьку молекулярну масу зв’язатися третьому доданому поліфенолу з більш специфічним сайтом зв’язування на альбуміні, що містить більше амінокислотних залишків, зокрема аргініну та лізину, та утворює більше водневих зв’язків. В цілому, присутність у потрійних комбінаціях двох однакових поліфенолів знижувало стабільність комплексів альбуміну відносно бінарних комбінацій з білками (через конкуренцію за сайти зв’язування на білку), тобто додавання третього поліфенолу вже не було енергетично вигідним.

На відміну від альбуміну, додавання до комплексу INS+GAL двох однакових поліфенолів (крім GAL і PHEN), призводило до 2-30% зростання стабільності комплексів (абсолютне значення енергії зв’язування знижувалося, Таблиця 2). Особливо сильно стабільність зросла при додаванні до комплексу INS+GAL двох молекул кверцетину (+22% відносно комплексу INS+GAL+QUER) або 2 молекул сезаміну (+22% відносно комплексу INS+GAL+SES). Зокрема, виявилося, що INS+GAL+QUER+QUER формує більше зв’язків з білком, зокрема, водневих, за наявності другої молекули – також кверцетину, ніж за наявності других у ряду поліфенолів іншої природи.

Натомість, порядок додавання різних за структурою молекул поліфенолів незначно впливав на сумарну енергію комплексу з альбуміном (енергія змінювалася на 4-5%), тобто різні за структурою поліфеноли майже не конкурують за сайти зв'язування на білку. В інсуліні порядок додавання є важливим, зокрема, для кверцетину. Його додавання важливе на другому, а не на третьому етапі докінгу, тоді він міцніше зв'язується з інсуліном, займаючи сайт, за який конкурують інші поліфеноли.

Судячи зі стабільності комплексів, альбумін буде найкращим нанопереносником для таких комбінацій поліфенолів: GAL+CUR\_K, GAL+SES, GAL+GAL+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+GAL+SES, GAL+PHEN+CUR\_K, GAL+PHEN+SES, оскільки їх енергія знижується на **38 – 48%** у порівнянні з комплексом PROTEIN+GAL (Таблиця 1). Тобто **куркумін** (кет-форма) і **сезамін** є найбільш оптимальною парою до **галової кислоти** (або до двох галових кислот чи галової і фенольної кислоти), які утворюють найбільш стійкі комплекси з альбуміном. Також для комплексів альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів третім поліфенолом у рядку краще обирати **CUR\_E, CUR\_K, QUER, SES**, бо вони мають вищу молекулярну масу і тому краще зв'язується з білком, у якого вже зайняті 2 сайти зв'язування.

Найбільш стабільні комплекси інсулін мав з такими комбінаціями поліфенолів: GAL+QUER+CUR\_E, GAL+QUER+QUER, GAL+QUER+SES, GAL+SES+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+SES+SES, оскільки їх енергія знижується на **61 – 85%** у порівнянні з комплексом INS+GAL. Тобто інсулін є найкращим переносником для **потрійних** комбінацій **галової кислоти з куркуміном (енольна форма), кверцетином і сезаміном**, але все одно відповідні комбінації у комплексі з альбуміном є стабільшими на 5-43%

Цікаво, що сезамін найкраще зв'язується з альбуміном у вигляді бінарної комбінації з галовою кислотою, або у вигляді потрійної комбінації з двома галовими чи однією фенольною кислотами (Таблиця 1). Аналіз сайтів

зв'язування показав, що у комплексах ALB+GAL+SES ALB+GAL+GAL+SES сезамін зв'язується з однаковими амінокислотними залишками субдоменом IB альбуміну, у комплексі ALB+GAL+PHEN+SES – з субдоменом IB, а у випадку, коли другим у ряду поліфенолом не є GAL, PHEN, відносно важка молекула SES витісняється з оптимального сайту зв'язування і тому ці комплекси є менш стабільними, ніж комплекс ALB+GAL+SES.

Таким чином, результати роботи показали, що як альбумін, так і інсулін можна використовувати як нанопереносники бінарних і потрійних комплексів поліфенолів. Але альбумін, схоже, є більш специфічним до всіх подвійних та потрійних комбінацій поліфенолів, через вищу молекулярну масу (наявність більшої кількості сайтів зв'язування). Також обидва білки мають найнижчу специфічність до галової та фенольної кислот (вищі значення енергії комплексів) та ресвератолу, оскільки ці молекули мають найнижчі значення молекулярної маси та утворюють переважно водневі контакти з білками, а інші поліфеноли – формують більше гідрофобних та ароматичних зв'язків. Зокрема, для альбуміну ALB+GAL+PHEN+CUR\_K, ALB+GAL+PHEN+SES, ALB+GAL+GAL+CUR\_E, ALB+GAL+GAL+CUR\_K, ALB+GAL+GAL+SES, INS+GAL+GAL+CUR\_K стабільність комплексів зростає на 40 – 60% у порівнянні з комплексом ALB+GAL. Також варто відзначити, що комплекси альбуміну з бінарними комбінаціями поліфенолів, імовірно, є навіть стабільнішими, ніж більшість комплексів альбуміну з потрійними комбінаціями поліфенолів, тому **альбумін найкраще використовувати для транспорту двох, а не трьох поліфенолів одночасно.**

Через брак місця на інсуліні третій поліфенол у ряду найчастіше формує контакти з другим поліфенолом у ряду, що може призвести до послаблення стабільності комплексу білка з потрійними комбінаціями поліфенолів, але докінг показує навпаки зростання на 10-60% у порівнянні зі стабільністю комплексів з бінарними комбінаціями поліфенолів.

Отримані результати також свідчать про те, що якщо альбумін не вичерпав свої можливості та можна спробувати протестувати його у якості

нанопереносника для чотирьох і більше поліфенолів, то у випадку інсуліну зв'язування третього у ряду поліфенолу з другим у ряду поліфенолом (та відсутність зв'язування з білком взагалі третього поліфенолу у комплексах) свідчить про те, що оптимальна кількість поліфенолів для перенесення цим білком дорівнює два.

Сайти зв'язування бінарних та потрійних комбінацій поліфенолів були переважно у субдомені ІВ (як гем) альбуміну, хоча майже не спостерігали зв'язування третього поліфенолу у ряду з такими ж амінокислотними залишками, що і другий або перший поліфенол. Тобто конкуренцію за сайти зв'язування краще досліджувати за допомогою молекулярної динаміки. Щодо інсуліну, конкуренцію більш видно через зв'язування третього поліфенолу у ряду з другим поліфенолом у ряду, але теж варто дослідити процес зв'язування за допомогою молекулярної динаміки. Наступним кроком у даному дослідженні може бути також заміна першого поліфенолу у ряду (галової кислоти) на інший поліфенол та повторення даного експерименту.

## ВИСНОВКИ

У роботі досліджено взаємодію поліфенолів з білками альбуміном та інсуліном з метою оцінки їхнього потенціалу як нанопереносників для бінарних і потрійних комбінацій біоактивних сполук. Методом молекулярного докінгу визначено енергетично вигідні конфігурації білок-поліфенольних комплексів та проаналізовано їхню стабільність. Отримані результати дозволили виявити структурні фактори, що впливають на ефективність зв'язування та можливість конкуренції за сайти зв'язування на білках.

1. З використанням методу молекулярного докінгу проведено комплексне дослідження щодо можливості використання сироваткового альбуміну людини та інсуліну як нанопереносників для бінарних і потрійних комбінацій поліфенолів, зокрема галової кислоти, фенольної кислоти, куркуміну (в енольній та кето-формі), кверцетину, ресвератролу та сезаміну. Результати моделювання дозволили визначити енергетично найвигідніші конфігурації зв'язування поліфенолів із кожним із досліджених білків.
2. Встановлено, що альбумін демонструє вищу здатність до стабільного зв'язування з низкою поліфенольних комбінацій, зокрема GAL+CUR\_K, GAL+SES, GAL+GAL+CUR\_E, GAL+GAL+SES, GAL+PHEN+CUR\_K, GAL+PHEN+SES, які забезпечують зниження енергії комплексу на 38-48% порівняно з референтним комплексом ALB+GAL. Для інсуліну найстабільнішими виявилися комплекси з комбінаціями GAL+QUER+CUR\_E, GAL+QUER+QUER, GAL+QUER+SES, GAL+SES+CUR\_E, GAL+GAL+CUR\_K, GAL+SES+SES зі зниженням енергії до 61-85% відносно INS+GAL, що свідчить про специфічність кожного білка до певних поліфенольних сполук.



3. Показано, що альбумін, порівняно з інсуліном, формує більш стабільні комплекси з поліфенолами як у бінарних, так і в потрійних комбінаціях. Крім того, встановлено, що при формуванні потрійних комплексів третя молекула поліфенолу часто вступає у конкурентну взаємодію з другою, утворюючи нековалентні зв'язки між собою, що особливо виражено у випадку інсуліну та свідчить про обмежену кількість доступних сайтів зв'язування на його поверхні.
4. Виявлено, що потрійні комбінації поліфенолів, які містять два однакових компоненти (наприклад, GAL+GAL або GAL+SAL), можуть знижувати стабільність комплексу з альбуміном у порівнянні з відповідними бінарними комбінаціями, ймовірно, через конкуренцію за однакові сайти зв'язування. Разом із цим встановлено, що стабільність потрійного комплексу зростає у випадку, коли галова кислота, фенольна кислота або ресвератрол займають друге, а не третє місце в ряду поліфенолів, адже за таких умов спостерігається покращення стабільності на 30-80% відносно бінарних комплексів.
5. В рамках подальших досліджень запропоновано провести варіаційний молекулярний докінг зі зміною послідовності та складу поліфенолів у комбінаціях, зокрема шляхом заміни галої кислоти на інші біоактивні сполуки, з метою валідації отриманих результатів. Додатково рекомендовано провести молекулярно-динамічне моделювання найперспективніших комплексів, що дозволить оцінити їхню стабільність у наближених до фізіологічних умовах середовищах та підтвердити їхню функціональну придатність як кандидатів для нанотранспорту поліфенолів.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cione E. et al. Quercetin, epigallocatechin gallate, curcumin, and resveratrol: from dietary sources to human microRNA modulation //Molecules. – 2019. – Т. 25. – №. 1. – С. 63.
2. Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigne, C.; Texier, O.; Regerat, F.; Remesy, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *Febs. Lett.* 1998, 426, 331–336
3. Gollucke, A.P.; Peres, R.C.; Odair, A., Jr.; Ribeiro, D.A. Polyphenols: A nutraceutical approach against diseases. *Recent Pat. Foodnutr. Agric.* 2013, 5, 214–219.
4. Rocha, Sonia, et al. "Nano-based drug delivery systems used as vehicles to enhance polyphenols therapeutic effect for diabetes mellitus treatment." *Pharmacological Research* 169 (2021): 105604.
5. Xiao, Yun, et al. "A review on protein based nanocarriers for polyphenols: Interaction and stabilization mechanisms." *Food Innovation and Advances* 2.3 (2023): 193-202.
6. Spada, Alessandra, et al. "The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery." *Molecular pharmaceutics* 18.5 (2021): 1862-1894.
7. Rahman, Md Saidur, et al. "Role of insulin in health and disease: an update." *International journal of molecular sciences* 22.12 (2021): 6403.
8. Shapiro, Haim, et al. "Inhaled aerosolized insulin: a “topical” anti-inflammatory treatment for acute lung injury and respiratory distress syndrome?." *Inflammation* 33 (2010): 315-319
9. Prabu, S. Lakshmana, et al. "Insulin-Based Drug Delivery Systems." *Natural Polymeric Materials based Drug Delivery Systems in Lung Diseases*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. 259-276.

10. Ryszkiewicz, Piotr, Barbara Malinowska, and Eberhard Schlicker. "Polypharmacology: promises and new drugs in 2022." *Pharmacological Reports* 75.4 (2023): 755-770.
11. Ferreira L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies // *Molecules*. – 2015. – T. 20. – №. 7. – C. 13384-13421.
12. Bialecka-Florjanczyk, E.; Fabiszewska, A.; Zieniuk, B. Phenolic acids derivatives - biotechnological methods of synthesis and bioactivity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2018, 19, 1098–1113
13. Zhang, Yunyue, et al. "Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity." *Food Chemistry* 240 (2018): 1072-1080.
14. Bronze-Uhle, E. S., et al. "Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid." *Nanotechnology, science and applications* (2016): 11-21.
15. Mohammad-Beigi, Hossein, et al. "Preparation and in vitro characterization of gallic acid-loaded human serum albumin nanoparticles." *Journal of nanoparticle research* 17 (2015): 1-16.
16. Majdalawieh, Amin F., et al. "Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of sesamin: mechanisms of action and future directions." *Critical reviews in food science and nutrition* 62.18 (2022): 5081-5112
17. Kittl, M.; Beyreis, M.; Tumurkhuu, M.; Furst, J.; Helm, K.; Pitschmann, A.; Gaisberger, M.; Glasl, S.; Ritter, M.; Jakab, M. Quercetin stimulates insulin secretion and reduces the viability of rat ins-1 beta-cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Phar.* 2016, 39, 278–293.
18. Peluso, I.; Serafini, M. Antioxidants from black and green tea: From dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br. J. Pharm.* 2017, 174, 1195–1208
19. Beneduci, A.; Corrente, G.A.; Marino, T.; Aiello, D.; Bartella, L.; Di Donna, L.; Napoli, A.; Russo, N.; Romeo, I.; Furia, E. Insight on the chelation of

- aluminum(iii) and iron(iii) by curcumin in aqueous solution. *J. Mol. Liq.* 2019, 296, 111805.
20. TEODORO, Miguel L.; PHILLIPS, George N.; KAVRAKI, Lydia E. Molecular docking: A problem with thousands of degrees of freedom. In: *Proceedings 2001 ICRA. IEEE International Conference on Robotics and Automation* (Cat. No. 01CH37164). IEEE, 2001. p. 960-965.
21. Dias R., de Azevedo J., Walter F. Molecular docking algorithms // *Current drug targets*. – 2008. – T. 9. – №. 12. – C. 1040-1047.
22. Timmers, L.F.; Caceres, R.A.; Vivan, A.L.; Gava, L.M.; Dias, R.; Ducati, R.G.; Basso, L.A.; Santos, D.S. and de Azevedo, W.F., Jr. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, 479, 28-38
23. Hefti F. F. Requirements for a lead compound to become a clinical candidate // *BMC neuroscience*. – 2008. – T. 9. – №. Suppl 3. – C. S7.
24. Rossi, A.; Marti-Renom, M.A. and Sali, A. (2006) *Protein Sci.*, 15(10), 2366-2380.
25. Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y.\* The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nature Protocols*, 2020; doi: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>.
26. YAN, Yumeng, et al. The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nature protocols*, 2020, 15.5: 1829-1852.
27. YAN, Yumeng, et al. Addressing recent docking challenges: A hybrid strategy to integrate template-based and free protein-protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2017, 85.3: 497-512.
28. Электронный ресурс:  
[http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/05\\_EM.html](http://www.mdtutorials.com/gmx/lysozyme/05_EM.html)
29. Pawar, Shravani S., and Sachin H. Rohane. "Review on discovery studio: An important tool for molecular docking." (2021): 1-3.
30. Che X., Liu Q., Zhang L. An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina // *Results in Engineering*. – 2023. – T. 19. – C. 101335.

31. Guizado T. R. C., Louro S. R. W., Anteneodo C. Dynamics of heme complexed with human serum albumin: a theoretical approach //European Biophysics Journal. – 2012. – T. 41. – C. 1033-1042.
32. Ascenzi P. et al. Ibuprofen impairs allosterically peroxynitrite isomerization by ferric human serum heme-albumin //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – T. 284. – №. 45. – C. 31006-31017.
33. U. Malovytsia et al. Polyphenol onteractions with functional proteins: a molecular docking study. EEJP — 2025, - submitted
34. Galato D. et al. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity //Redox Report. – 2001. – T. 6. – №. 4. – C. 243-250.