

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.03.077>

УДК 577.(31;112.7):615.(017;015.1)

**В.Б. Ларіонов**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>

**В.С. Акішева**<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-0897-1253>

**М.Я. Головенко**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>

**О.А. Макаренко**<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-2029-4392>

**І.Ю. Борисюк**<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2824-9118>

<sup>1</sup> Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса

<sup>2</sup> Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова

<sup>3</sup> Одеський національний медичний університет

E-mail: [vitaliy.larionov@gmail.com](mailto:vitaliy.larionov@gmail.com), [n.golovenko@gmail.com](mailto:n.golovenko@gmail.com), [human\\_physiology@onu.edu.ua](mailto:human_physiology@onu.edu.ua)

## Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом і його фармакологічні наслідки

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.Є. Кузьмінім

Сироватковий альбумін відіграє важливу роль у багатьох фізіологічних процесах. Останнім часом показано його безпосередню участь у реалізації протизапальних процесів. Багато нестероїдних протизапальних засобів, зокрема, виявляють захисний ефект проти теплової денатурації сироваткового альбуміну. У роботі наведено результати вивчення протизапальної активності *in vitro* пропоксазепаму та ряду похідних 1,4-бенздіазепіну за ефектом протективного впливу на стабільність сироваткового альбуміну в умовах термічної денатурації. Протективний ефект сполук розраховували як  $IC_{50}$ , фізико-хімічні параметри визначали за допомогою програм ACD/Labs 12.01 та Chem Axon ( Marvin Sketch 21.7). Встановлено, що за величинами  $IC_{50}$  діазепам і пропоксазепам майже вдвічі перевищують референтний препарат ібупрофен. Сполуки з вільною гідроксигрупою в положенні 3 (оксазепам та 3-гідроксипропоксазепам) виявляли менший ефект, що може бути пов'язано з їх здатністю до зв'язування з бичачим сироватковим альбуміном. Поляризованість молекули похідних 1,4-бенздіазепіну більшою мірою впливає на їх зв'язування з бичачим сироватковим альбуміном та прояв їх захисної дії, ніж ліпофільність, що дає підставу припустити значний внесок індукційної взаємодії у цей процес.

**Ключові слова:** сироватковий альбумін, пропоксазепам, ібупрофен, тепла денатурація, похідні 1,4-бенздіазепіну.

Цитування: Ларіонов В.Б., Акішева В.С., Головенко М.Я., Макаренко О.А., Борисюк І.Ю. Пригнічення термоіндукованої денатурації бичачого сироваткового альбуміну пропоксазепамом і його фармакологічні наслідки. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2022. № 3. С. 77–86. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.03.077>

Важлива роль сироваткового альбуміну у фізіологічних процесах добре відома [1], проте наразі ведуться дослідження, що викривають значний внесок цієї сполуки не тільки у процеси, які пов'язані з його фізико-хімічними властивостями (абсорбційна здатність, іонізація та підтримка буферної ємності, підтримка онкотичного тиску), але й ті, що безпосередньо залучені до біологічної відповіді та підтримки гомеостазу організму [2]. Модифікації структури сироваткового альбуміну більшою чи меншою мірою спостерігаються за різних патологічних станів, що супроводжуються запаленням, і мають переважний вплив на стан судин та нирок [3], або у разі порушень метаболічного стану, зокрема, діабету [3, 4]. Фізіологічно сироватковий альбумін існує переважно у відновленій формі (меркаптоальбумін) і його тіолові групи беруть участь у передачі сигналів регуляторним клітинам (нейтрофілам) [5], безпосередній регуляції рівня глутатіону, активації ядерного фактора капша у клітинах [6] і є скевенджерами вільних радикалів та активних форм кисню, що спричиняють запалення [7].

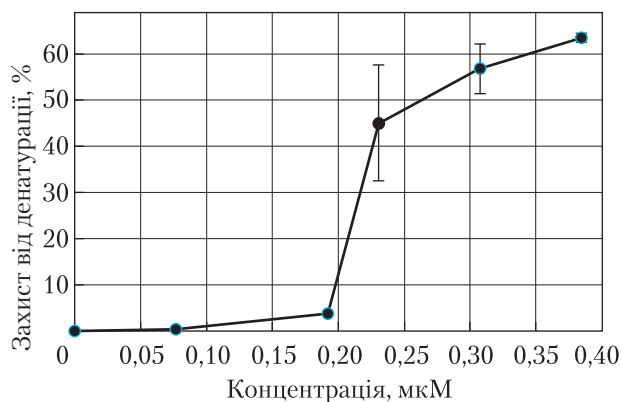
Належне виконання функцій білків здійснюється лише за умов зберігання просторової структури, втрата чи порушення якої призводять до денатурації. Відомо, що деякі ендогенні (солі жовчних кислот, аліфатичні кислоти тощо) та екзогенні (нестероїдні протизапальні засоби) сполуки здатні захищати сироватковий альбумін від денатурації [8]. Це явище навіть покладено в основу скринінгового методу попередньої оцінки протизапальних властивостей біологічно активних сполук.

У Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України синтезовано сполуку 7-бром-5-(*o*-хлорфеніл)-3-пропокси-1,2-дигідро-3*H*-1,4-бенздіазепін-2-он (пропоксазепам), яка має значні анальгетичні властивості, що реалізуються переважно через центральні механізми [9]. Утім, вона також має певні протизапальні властивості, реалізація яких припускає наявність і периферичних механізмів [10]. Сполука є високоліпофільною, тому її масоперенос в організмі здійснюється за участю транспортних білків крові, зокрема сироваткового альбуміну. Беручи до уваги залученість до реалізації протизапальної дії сироваткового альбуміну, а також для більш поглибленого розуміння механізмів дії пропоксазепаму необхідно вивчити можливий вплив цієї сполуки на його термічну стабільність.

Метою дослідження було вивчення протизапальної активності *in vitro* пропоксазепаму та ряду похідних 1,4-бенздіазепіну за ефектом протективного впливу на стабільність сироваткового альбуміну в умовах термічної денатурації.

**Матеріали та методи.** У дослідженні використано бичачий сироватковий альбумін (БСА) ("Sigma-Aldrich", США), розчинений до концентрації 4 % у трис-ацетатному буфері (0,01 М, рН 7,6). Досліджуваними сполуками були субстанції оксазепаму, діазепаму, пропоксазепаму та його метаболіту (3-гідроксипохідного). Позитивним контролем і референтною сполукою був ібупрофен. Із вихідних метанольних розчинів сполук у концентраціях 15–60 мМ готували тест-зразки ібупрофену з концентраціями 1,5–20 мкМ та похідних 1,4-бенздіазепіну (0,6–6 мкМ).

Для визначення протективної дії сполук в умовах термічної денатурації БСА до 2 мл розчину білка додавали 40 мкл робочого розчину сполуки в різних концентраціях, перемішували та інкубували 15 хв при 37 °С з подальшим 12-хвилинним нагріванням при 79 °С на водяній бані, опісля охолоджували при кімнатній температурі та визначали оптичну щіль-



**Рис. 1.** Концентраційна залежність захисного ефекту ібупрофену проти термічної денатурації БСА

ність при 660 нм. Ступінь протективної дії визначали за формулою

$$\% \text{ prot} = \frac{A_{\text{contr}} - A_{\text{exp}}}{A_{\text{cont}}} \cdot 100,$$

де % prot — відсоток захисту від денатурації;  $A_{\text{exp}}$  — поглинання досліджуваного розчину;  $A_{\text{contr}}$  — поглинання контрольного розчину (розчин альбуміну з метанолом). Значення  $IC_{50}$  (концентрація, що забезпечує 50 % гальмування термічної денатурації БСА) розраховували як величину —  $b/k$ , де  $k$  та  $b$  — кут нахилу і відрізок на осі ординат прямої у координатах:  $C, \lg((\% \text{ max}/\% \text{ prot})-1)$ .

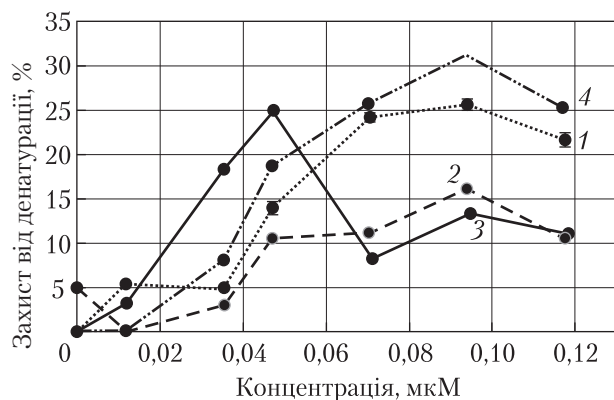
Фізико-хімічні показники сполук (молекулярну масу, молекулярний об'єм, молекулярну рефракцію, парахор, поляризованість) розраховували за допомогою програми ACD/Labs 12.01, дипольний момент і коефіцієнт розподілу при рН 7 (logD) — за допомогою програми Chem Axom (Marvin Sketch 21.7).

Отримані експериментальні дані наведені у вигляді середнє  $\pm$  стандартне відхилення від середнього.

**Результати.** У тесті пригнічення термічної денатурації БСА усі досліджувані сполуки виявили дозозалежний ефект (рис. 1, 2), при цьому форма кривих “концентрація сполуки — відсоток захисту” має сигмоїдний характер. Для похідних 1,4-бенздіазепіну (див. рис. 2), на

**Таблиця 1.** Показники  $IC_{50}$  1,4-бенздіазепіну та ібупрофену щодо гальмування термічної денатурації БСА

Сполука	$IC_{50}$ , мкМ	Максимальний захисний ефект, %max
Діазепам	0,077	31,22
Оксазепам	0,117	24,88
3-Гідроксипропоксазепам	0,107	11,18
Пропоксазепам	0,077	25,64
Ібупрофен	0,134	59,57



**Рис. 2.** Концентраційна залежність захисного ефекту пропоксазепаму (1), 3-гідроксипропоксазепаму (2), оксазепаму (3) та діазепаму (4) проти термічної денатурації БСА

відміну від ібупрофену (див. рис. 1), зі збільшенням концентрації, що виявляє максимальний ефект, не спостерігається досягнення сталого ефекту протективної дії, а навпаки, відмічається деяке зниження захисного ефекту.

Величина  $IC_{50}$  захисного ефекту на теплову денатурацію альбуміну є найбільшою для ібупрофену (табл. 1), тоді як похідні 1,4-бензодіазепіну виявляють більш значний ефект (тобто мають менші величини  $IC_{50}$ ). Утім максимальна величина захисного ефекту ібупрофену (59,57 %) значно перевищує аналогічний показник для похідних 1,4-бенздіазепіну, з яких діазепам є більш ефективним (31,22 %).

Для визначення фізико-хімічних показників сполук, які опосередковують стабілізаційну властивість структури альбуміну, піддану термічній денатурації, були розраховані (табл. 2) молекулярна маса, молекулярний об'єм, молекулярна рефракція, паракор, поляризованість, дипольний момент і коефіцієнт розподілу при рН 7,4 ( $\log D$ ). Їх вибір обумовлено припущенням, що зв'язування і, відповідно, стабілізація структури протеїну зазнають впливу таких чинників, як розмір молекули, здатність до поляризації та, відповідно, утворення міжмолекулярних зв'язків. Також аналіз охоплював і показник ліпофільності за фізіологічних умов (рН 7,4), оскільки гідрофобні взаємодії є одним з провідних факторів в утворенні зв'язків між сироватковим альбуміном та неспецифічними лігандами.

**Обговорення результатів.** Оцінка протизапальної дії речовин проводиться на моделях гострого (карагенановий набряк), підгострого (формаліновий набряк) та хронічного (ад'ювантний артрит) запалень. Існують певні проблеми в експериментальних фармакологічних дослідженнях на тваринах, наприклад етичні питання, та відсутність обґрунтування для їх використання, коли доступні або наявні інші відповідні методи. Тому у цьому дослідженні протизапальні властивості сполук оцінювались *in vitro* методом біоаналізу денатурації білка. Денатурація тканинних білків є одним із добре задокументованих [11] причин запальних і артритних захворювань за рахунок продукції аутоантігенів. Тому засоби, які можуть запобігти денатурації білка є корисними для розробки протизапальних препаратів.

Запалення є комплексним процесом, розвиток якого не тільки контролюється специфічними медіаторами, але й супроводжується дисбалансом антиоксидантної системи і

Таблиця 2. Фізико-хімічні параметри досліджуваних сполук

Показник	Діазепам	Оксазепам	3-Гідрокси-пропоксазепам	Пропоксазепам	Ібупрофен
Молекулярна маса, г/моль	284,74	286,71	365,61	407,69	220,31
Молекулярний об'єм, см <sup>3</sup> /моль	225,8 ± 7,0	201,8 ± 7,0	214,4 ± 7,0	270,9 ± 7,0	216,8 ± 3,0
Парахор, см <sup>3</sup>	588,6 ± 8,0	548,8 ± 8,0	592,3 ± 8,0	714,1 ± 8,0	537,4 ± 4,0
Молекулярна рефракція, см <sup>3</sup> /моль	80,9 ± 0,5	76,43 ± 0,5	83,99 ± 0,5	98,17 ± 0,5	65,40 ± 0,3
Поляризованість, 10 <sup>-24</sup> , см	32,07 ± 0,5	30,30 ± 0,5	33,29 ± 0,5	38,91 ± 0,5	25,93 ± 0,5
Коефіцієнт розподілу, logD (pH 7,4)	3,08	2,92	3,69	5,21	1,27

генерацією вільних радикалів, а альбумін, завдяки наявності тіольних груп, виявляє антиоксидантні та антирадикальні властивості [5, 7]. Цілком природно, що в результаті цього процесу молекули альбуміну зазнають хімічної модифікації, що призводить до втрати нативної конформації молекули (частковій денатурації), зменшення його адсорбційних і транспортних властивостей та підвищення ступеня протеолітичної деградації.

Відомо, що альбумін має декілька місць зв'язування ендогенних та екзогенних сполук, виконуючи роль неспецифічного “мовчазного” рецептора. Оскільки утворення комплексу з певними лігандами може стабілізувати молекулу альбуміну, слід очікувати, що такі сполуки матимуть неспецифічний вплив на запалення. Так, для нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) було виявлено високу кореляцію між їх протизапальним ефектом і ступенем захисної дії проти термічної денатурації в умовах *in vitro* [8], що в умовах *in vivo*, ймовірно, має синергічний ефект, який поєднується з їх прямою активністю завдяки гальмуванню циклооксигеназ. Зазначене є передумовою для оцінки можливої протективної дії пропоксазепаму проти термічно-індукованої денатурації сироваткового альбуміну. Поряд з пропоксазепамом також було

визначено протективний ефект низки похідних 1,4-бенздіазепіну — діазепаму, який має власне місце зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну, його кінцевого метаболіту, оксазепаму та 3-гідроксипропосазепаму — метаболіту пропосазепаму [12]. Референтним препаратом служив ібупрофен, що є одним з відомих і широко вживаних НПЗП.

Досліджувані сполуки мають певний вплив на гальмування процесу термічної денатурації БСА, який відрізняється за величиною та характером прояву (див. рис.1, 2). Форма залежності “концентрація—ефект” для ібупрофену має класичний S-подібний вигляд з максимальним ефектом ~ 60 % (див. табл. 1). Для похідних 1,4-бенздіазепіну спостерігається слабо виражений максимум і подальше часткове зменшення величини протективного ефекту із підвищенням концентрації досліджуваної сполуки (див. рис. 2). Іншою особливістю, що притаманна похідним 1,4-бенздіазепіну, є відносно незначне значення максимального ефекту (див. табл. 1), і лише для діазепаму воно сягає більш ніж 30 %, тоді як для 3-гідроксипропосазепаму цей ефект є найменшим.

Особливою мірою ефективності протективної дії сполук є показник концентрації, за якої досягається напівмаксимальний ефект ( $IC_{50}$ ) гальмування термічної денатурації (див. табл.1). За ним найбільш ефективними є діазепам та пропосазепам (чим менша величина концентрації, тим більш активною є сполука), тоді як ібупрофен, навіть із високим значенням максимального ефекту (% max), досягає порівнянного напівмаксимального ефекту за значно вищих концентрацій.

Вочевидь, ступінь та сила зв'язування сполук з БСА та їх протективний ефект залежать від їх структури і фізико-хімічних властивостей молекул. Незважаючи на те, що місця зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну знаходяться на його поверхні, молекулярний об'єм може вважатися досить важливою характеристикою, яка визначає можливість взаємодії цих молекул. Молекулярна маса досліджуваних сполук значно відрізняється навіть серед похідних 1,4-бенздіазепіну, що обумовлено наявністю різних радикалів, які входять до складу молекул. Переважно, це атом бром у положенні 7 (пропосазепам та його метаболіт), який значно більший за атом хлору (діазепам та оксазепам). Це відображується не тільки на молекулярному об'ємі, але й на величині парохору, який характеризує молекулярний об'єм сполуки за рівноважного поверхневого натягу (див. табл. 2). Так, найбільші показники мають пропосазепам та 3-гідроксипропосазепам, що вказує на значний внесок атома бром у загальний молекулярний об'єм. Водночас, хоча ібупрофен і характеризується найменшими величинами молекулярного об'єму та парохору, слід визнати, що ізобутиловий радикал в положенні 4 також є досить об'ємним, як і рухомий пропілоксирадикал пропосазепаму.

Транспортна функція сироваткового альбуміну спрямована на зв'язування переважно сполук з високою ліпофільністю, оскільки гідрофільні речовини легше екскретуються з організму. Відповідно, сполуки із високою ліпофільністю повинні мати вищий ступінь зв'язування з альбуміном і стабілізувати його під час термічної денатурації. Дійсно, за великою  $IC_{50}$  (див. табл. 1) діазепам та пропосазепам, які є більш ліпофільними (див. табл. 2), виявляють і значно вищі протективні властивості. Всупереч цьому максимальний захисний ефект ібупрофену (див. табл. 1) обумовлений іншими доменами зв'язування, ніж бенздіазепінів, а також силою взаємодії між лігандами та сайтами альбуміну. В утворенні комплексу беруть участь електростатичні, водневі, ван-дер-ваальсові сили тощо. Ібупро-

фен за фізіологічних умов частково іонізований (завдяки чому величина  $\log D$  становить 1,27, тоді як  $\log P$  дорівнює 4,03), що дає йому змогу формувати як електростатичні зв'язки за рахунок карбоксильного аніона, так і гідрофобні за рахунок  $\pi$ -електронів бензольного кільця та гідрофобних взаємодій ізопропільного радикала. Досліджувані похідні 1,4-бензодіазепіну в умовах організму не зазнають іонізації і, відповідно, мають високі значення ліпофільності. Оскільки за величиною  $IC_{50}$  ці сполуки значно активніші, ніж ібупрофен, можна припустити, що взаємодія у бензодіазепіновому місці зв'язування залучає також інші, крім електростатичних, взаємодії, зокрема індукційні сили, що виникають між молекулами з високою поляризованістю. Так, похідні 1,4-бензодіазепіну мають значно вищу, ніж ібупрофен, поляризованість і, відповідно, молекулярну рефракцію, як міру здатності рухомості електронної щільності, що передбачає значний внесок цього типу взаємодії. Ймовірно, це також обумовлює наявність максимуму на графіках залежності протективної дії похідних 1,4-бензодіазепіну. З підвищенням концентрації сполук спостерігається певний "проденатураційний" ефект, оскільки це може призвести не тільки до посилення зв'язування з діазепіновим сайтом БСА, але також і з неспецифічними ділянками молекули протеїну, що порушує його конформацію та четвертинну структуру. Втім, в умовах *in vivo* зазначений ефект надлишкових концентрацій бензодіазепінів не матиме значного впливу на стабільність молекули сироваткового альбуміну, оскільки ці сполуки застосовують у значно нижчих дозах. Також слід зазначити, що сполуки з вільною гідроксигрупою в положенні 3 (3-гідроксипропоксазепам та оксазепам) мають менший захисний ефект (за величиною  $IC_{50}$ ), імовірно, внаслідок того, що полярна гідроксигрупа за такого типу взаємодії погіршує зв'язування сполук із сироватковим альбуміном.

За винятком пропоксазепаму похідним 1,4-бензодіазепіну не притаманний протизапальний ефект, хоча високі дози діазепаму також виявляють такі властивості в умовах карагенанового тесту, що обумовлено його впливом на систему NO [13].

Раніше [10] на різних моделях запалення було встановлено ефективну дію пропоксазепаму. У тесті на набряк лапи, спричинений карагенаном, показано, що інгібіторна активність пропоксазепаму залежить від дози і є найвищою, коли доза сполуки становить 10 мг/кг.

Формаліновий тест чутливий до НПЗП та інших легких анальгетиків. Він має дві окремі фази, які відображають різні стадії болю. Рання фаза обумовлена безпосереднім впливом формаліну на ноцицептори (незапальний біль), тоді як пізня фаза відображає запальний біль. Результати дослідження показують, що введення пропоксазепаму також дозозалежно послаблює ноцицептивну відповідь як у нейрогенній, так і в запальній фазі у мишей на рівні диклофенаку натрію.

Є достовірні факти, які свідчать про те, що протизапальна дія сполук на карагенановій моделі має місце за участі кількох хімічних медіаторів — гістаміну, серотоніну, брадикініну та простагландинів. Ноцицепція, індукована формаліном, пов'язана з прямою дією сполук на TRPA1 канали, що розташовані на волокнах C [14]. Водночас у досліджах на ізольованих сироваткових альбумінах карагенан та формалін у відповідних умовах здатні порушувати конформацію білка і спричиняти його денатурацію. Тому виявлений захисний ефект проти термічної денатурації сироваткового альбуміну може бути неспецифічним додатковим механізмом дії деяких з похідних 1,4-бензодіазепіну в умовах *in vivo*, а також є підґрунтям для

подальшого вивчення фізико-хімічних особливостей периферичної дії сполук, які традиційно розглядаються лише як нейротропні.

**Висновки.** Похідні 1,4-бенздіазепіну виявляють певний протективний ефект проти термічної денатурації БСА. За величинами  $IC_{50}$  діазепам і пропоксазепам майже вдвічі перевищують референтний препарат ібупрофен, хоча й поступаються йому за величиною максимального ефекту. Сполуки з вільною гідроксигрупою в положенні 3 (оксазепам та 3-гідроксипропоксазепам) мають менший ефект, що може бути пов'язано з їх здатністю до зв'язування з БСА.

Поляризованість молекул похідних 1,4-бенздіазепіну більшою мірою впливає на їх зв'язування з БСА та прояв їх захисної дії, ніж ліпофільність, що дає підставу припустити значний внесок індукційної взаємодії в процес зв'язування з сироватковим альбуміном.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Merlot A.M., Kalinowski D.S., Richardson D.R. Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein. *Front Physiol.* 2014. **5**. 299. 8 pp. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00299>
2. Don B.R., Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin. Dial.* 2004. **17**, Iss. 6. P. 432–437. <https://doi.org/10.1111/j.0894-0959.2004.17603.x>
3. Donadio C., Tognotti D., Donadio E. Albumin modification and fragmentation in renal disease. *Clin. Chim. Acta.* 2012. **413**, Iss. 3-4. P. 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.009>
4. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie.* 2011. **93**, Iss. 4. P. 645–658. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>
5. Haddad J.J. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell. Signal.* 2002. **14**, Iss. 10. P. 799–810. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00022-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00022-0)
6. Cantin A.M., Paquette B., Richter M., Larivée P. Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. **162**, Iss. 4. P. 1539-1546. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9910106>
7. Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology.* 2005. **41**, Iss. 6. P. 1211–1219. <https://doi.org/10.1002/hep.20720>
8. Saso L., Valentini G., Casini M.L., Mattei E., Braghiroli L., Mazzanti G., Panzironi C., Grippa E., Silvestrini B. Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: a new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases. *Jpn. J. Pharmacol.* 1999. **79**, Iss. 1. P. 89–99. <https://doi.org/10.1254/jjp.79.89>
9. Golovenko M., Reder A., Andronati S., Larionov V. Evidence for the involvement of the GABA-ergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats. *J. Pre-Clin. Clin. Res.* 2019. **13**, № 3. P. 99–105. <https://doi.org/10.26444/jpccr/110430>
10. Golovenko N.Y., Kabanova T.A., Andronati S.A., Halimova O.I., Larionov V.B., Reder A.S. Anti-inflammatory effects of propoxazepam on different models of inflammation. *Int. J. Med. Med. Res.* 2020. **5**, № 2. P. 105–112. <https://doi.org/10.11603/ijmmr.2413-6077.2019.2.10900>
11. Opie E.L. On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J. Exp. Med.* 1962. **115**. P. 597–608. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.597>
12. Valivodz I.P., Golovenko M.Ya., Larionov V.B. ADME properties and tentative identification of metabolites of propoxazepam in mice by radioactive carbon and UPLC-MS/MS methods. *Modern approaches to the introduction of science into practice: Abstracts of X International Scientific and Practical Conference (San Francisco, USA, March 30–31 2020)*. San Francisco, 2020. P. 335–338.
13. Lazzarini R., Maiorka P.C., Liu J., Papadopoulos V., Palermo-Neto J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxide. *Life Sci.* 2006. **78**, № 23. P. 5345–5352. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.032>



14. McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. **104**, № 33. P. 13525–13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>

Надійшло до редакції 31.01.2022

## REFERENCES

1. Merlot, A. M., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. (2014). Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Front Physiol.*, 5, 299. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00299>
2. Don, B. R. & Kaysen, G. (2004). Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin Dial.*, 17, Iss. 6, pp. 432-437. <https://doi.org/10.1111/j.0894-0959.2004.17603.x>
3. Donadio, C., Tognotti, D. & Donadio, E. (2012). Albumin modification and fragmentation in renal disease. *Clin. Chim. Acta.*, 413, Iss. 3-4, pp. 391-395. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.009>
4. Rondeau, P. & Bourdon, E. (2011). The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie*, 93, Iss. 4, pp. 645-658. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>
5. Haddad, J. J. (2002). Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell. Signal.*, 14, Iss. 10, pp. 799-810. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(02\)00022-0](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00022-0)
6. Cantin, A. M., Paquette, B., Richter, M. & Larivée, P. (2000). Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162, Iss. 4, pp. 1539-1546. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9910106>
7. Quinlan, G. J., Martin, G. S. & Evans, T. W. (2005). Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41, Iss. 6, pp. 1211-1219. <https://doi.org/10.1002/hep.20720>
8. Saso, L., Valentini, G., Casini, M. L., Mattei, E., Braghiroli, L., Mazzanti, G., Panzironi, C., Grippa, E. & Silvestrini, B. (1999). Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: a new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79, Iss. 1, pp. 89-99. <https://doi.org/10.1254/jjp.79.89>
9. Golovenko, M., Reder, A., Andronati, S. & Larionov, V. (2019). Evidence for the involvement of the GABAergic pathway in the anticonvulsant and antinociception activity of Propoxazepam in mice and rats. *J. Pre-Clin. Clin. Res.*, 13, No. 3, pp. 99-105. <https://doi.org/10.26444/jpccr/110430>
10. Golovenko, N. Y., Kabanova, T. A., Andronati, S. A., Halimova, O. I., Larionov, V. B., & Reder, A. S. (2019). Anti-inflammatory effects of propoxazepam on different models of inflammation. *Int. J. Med. Med. Res.*, 5, No. 2, pp. 105-112. <https://doi.org/10.11603/ijmmr.2413-6077.2019.2.10900>
11. Opie, E. L. (1962). On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J. Exp. Med.*, 115, pp. 597-608. <https://doi.org/10.1084/jem.115.3.597>
12. Valivodz, I. P., Golovenko, M. Ya. & Larionov, V. B. (2020, March). ADME properties and tentative identification of metabolites of propoxazepam in mice by radioactive carbon and UPLC-MS/MS methods. Abstracts of X International Scientific and Practical Conference Modern approaches to the introduction of science into practice (pp. 335-338). San Francisco, USA.
13. Lazzarini, R., Maiorka, P. C., Liu, J., Papadopoulos, V. & Palermo-Neto, J. (2006). Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxide. *Life Sci.*, 78, No. 23, pp. 5345-5352. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.032>
14. McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M. & Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, No. 33, pp. 13525-13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>

Received 31.01.2022

*V.B. Larionov*<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2678-4264>

*A.S. Akisheva*<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-0897-1253>

*M.Ya. Golovenko*<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1485-128X>

*O.A. Makarenko*<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-2029-4392>

*I.Yu. Borisyuk*<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-2824-9118>

<sup>1</sup> A.V. Bogatskiy Physical-Chemical Institute of the NAS of Ukraine, Odessa

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Odessa National University

<sup>3</sup> Odessa National Medical University

E-mail: [vitaliy.larionov@gmail.com](mailto:vitaliy.larionov@gmail.com), [n.golovenko@gmail.com](mailto:n.golovenko@gmail.com), [human\\_physiology@onu.edu.ua](mailto:human_physiology@onu.edu.ua)

#### INHIBITION OF THERMOINDUCED DENATURATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN BY PROPOXAZEPAM AND ITS PHARMACOLOGICAL CONSEQUENCES

Serum albumin plays an important role in many physiological processes and has recently been shown to be directly involved in the anti-inflammatory processes. Many nonsteroidal anti-inflammatory drugs, in particular, have a protective effect against thermal denaturation of serum albumin. The aim of the work was studying of the *in vitro* anti-inflammatory activity of propoxazepam and a number of 1,4-benzodiazepine derivatives based on the protective effect on the stability of serum albumin under thermal denaturation. The protective effect of the compounds was expressed as IC<sub>50</sub>, physicochemical parameters were calculated using the programs ACD/Labs 12.01 and Chem Axom (Marvin Sketch 21.7). The IC<sub>50</sub> values for diazepam and propoxazepam were found to be almost twice as high as the reference drug ibuprofen. Compounds with the free hydroxy group at position 3 (oxazepam and 3-hydroxypropoxazepam) showed less effect, which may be due to their ability to bind to BSA. The polarizability of the molecule of 1,4-benzodiazepine derivatives has a greater effect on their binding to BSA and the manifestation of their protective effect than lipophilicity, which suggests a significant contribution of induction interaction in the process of binding to serum albumin.

**Keywords:** *serum albumin, propoxazepam, heat denaturation, 1,4-benzodiazepine derivatives, ibuprofen.*