

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри професор Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**ОЦІНКА БІОДОСТУПНОСТІ ДОКСОРУБЦИНУ, АСОЦІЙОВАНОГО
З БІЛКОВИМИ НОСІЯМИ**

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю
162 «Біотехнології та біоінженерія»
Вольвач Ірини Віталіївни

Науковий керівник від кафедри
д-р філософії Нікітіна Н. С.

Робота виконана у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом завідувача лабораторії імунобіології, д-ра біол. наук, проф. Колибо Дениса Володимировича

Оцінка захисту роботи

(підпис завідувача кафедри)

Київ – 2026 р.

АНОТАЦІЯ

Спектроскопічними, хроматографічними та клітинними методами проаналізовано комплексоутворення доксорубіцину з сироватковим альбуміном за умов нековалентного та ковалентного зв'язування, оцінено їх біологічну активність та ефективність використання альбуміну як природного носія протипухлинних препаратів.

Встановлено, що тип зв'язування впливає на стабільність, характер вивільнення, а також протипухлинну дію систем. Для ковалентних комплексів характерні змінені спектральні характеристики білка, вища константа зв'язування, порівняно з нековалентними, та стабільність, що підтверджено хроматографічним аналізом. Дослідження процесу вивільнення показало відмінності у його кінетиці для різних систем. З ковалентних систем препарат вивільняється повільніше, що забезпечує його пролонговану дію.

Модифікація типу зв'язування також впливає на біологічну активність доксорубіцину *in vitro*, зокрема на його протипухлинну ефективність щодо клітинної лінії U-373. Отже, сироватковий альбумін залучається до формування ефективних систем доставки доксорубіцину, визначаючи їх стабільність, кінетику вивільнення та біологічну активність.

Кваліфікаційна робота викладена на 43 сторінках, ілюстрована 7 рисунками, 2 таблицями та 1 гістограмою. Список використаних джерел включає 45 робіт.

Ключові слова: сироватковий альбумін, доксорубіцин, комплексоутворення, ковалентні комплекси, нековалентні комплекси, цитотоксичність.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГБО	–	гіпербарична оксигенотерапія;
ГЕБ	–	гематоенцефалічний бар'єр;
ПЕГ	–	поліетиленгліколь;
AMPK	–	AMP-activated protein kinase (АМФ-активована протеїнкіназа);
DOX	–	Doxorubicin (доксорубіцин);
HSA	–	Human serum albumin (людський сироватковий альбумін);
MDR	–	Multidrug resistance (мультирезистентність);
SPARC	–	Secreted protein acidic and rich in cysteine (кислий секретований білок та багатий на цистеїн).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Доксорубіцин у системах білкового транспорту	6
1.1. Доксорубіцин як протипухлинний препарат: механізм дії та клінічні обмеження.....	6
1.2. Біодоступність доксорубіцину та підходи до її підвищення.....	10
1.3. Сироватковий альбумін як білковий носій лікарських сполук.....	14
1.4. Молекулярні основи формування комплексів білок–ліганд.....	17
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	22
2.1. Опис використаних речовин та обладнання.....	22
2.2. Отримання комплексів доксорубіцину з альбуміном.....	23
2.3. Фізико-хімічні методи аналізу комплексоутворення.....	24
2.4. Визначення біологічної активності препарату <i>in vitro</i>	26
2.5. Статистичне оброблення результатів.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	29
3.1. Оцінка спектральних змін альбуміну при додаванні доксорубіцину.....	29
3.2. Флуориметричний аналіз комплексоутворення.....	31
3.3. Аналіз комплексоутворення за результатами гель-фільтрації.....	35
3.4. Динаміка вивільнення доксорубіцину.....	37
3.5. Біологічна активність доксорубіцину, асоційованого з альбуміном.....	39
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44
ДОДАТКИ	50

ВСТУП

Ефективне лікування онкологічних захворювань є важливим напрямом сучасної фармацевтичної науки, адже результативність протипухлинної терапії більшою мірою визначається здатністю лікарського засобу досягати цільових тканин у терапевтичних концентраціях. Одним із найбільш поширених препаратів є доксорубіцин – препарат антрациклінового ряду, який застосовується у хеміотерапії численних видів раку. Механізм його дії пов'язаний з інтеркаляцією в ДНК та інгібуванням топоізомерази II, що призводить до пригнічення проліферації пухлинних клітин. Проте, незважаючи на його високу протипухлинну активність, розвиток хеміорезистентності, недостатньої селективності накопичення у пухлинних тканинах, незворотних кардіотоксичних та зворотних нефротоксичних ефектів обмежують його клінічне застосування [1].

Перспективним підходом до підвищення терапевтичної ефективності доксорубіцину без спричинення побічних ефектів є використання білкових носіїв, які здатні покращувати фармакокінетичний профіль препарату, підвищувати його біодоступність, а також забезпечувати цільову доставку до патологічного вогнища.

Зважаючи на необхідність підвищення ефективності та безпечності протипухлинної терапії, тема роботи щодо вивчення біодоступності доксорубіцину, асоційованого з білковими молекулами, є актуальною.

Метою роботи було одержати нековалентні та ковалентні комплекси доксорубіцину з сироватковим альбуміном, визначити їхні фізико-хімічні та біологічні властивості та оцінити вплив типу взаємодії на стабільність, кінетику вивільнення та протипухлинну активність систем *in vitro*.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати нековалентні та ковалентні комплекси й дослідити структурні зміни в отриманих системах методом УФ-спектрофотометрії.

2. Дослідити взаємодію доксорубіцину з сироватковим альбуміном методом флуориметрії та визначити значення параметрів зв'язування для різних типів взаємодій.

3. Підтвердити утворення та стабільність комплексів методом гель-фільтраційної хроматографії.

4. Оцінити вплив типу зв'язування на кінетику вивільнення препарату та біологічну активність систем *in vitro*.

РОЗДІЛ 1

ДОКСОРУБІЦИН У СИСТЕМАХ БІЛКОВОГО ТРАНСПОРТУ

1.1. Доксорубіцин як протипухлинний препарат: механізм дії та клінічні обмеження

Доксорубіцин належить до найпоширеніших хеміотерапевтичних засобів, який отримують з бактерій *Streptomyces peucetius* [2] та протягом більше ніж 30 років використовується для лікування численних онкологічних захворювань. Його призначають при раку молочної залози, яєчників та матки [3], сечового міхура, лімфом, лейкемій, а також сарком м'яких тканин та кісток [3, 4]. Препарат належить до протипухлинних препаратів антрациклінового ряду та вперше був введений у клінічну практику під назвою «Адріаміцин». До аналогічної групи препаратів відносять даунорубіцин – його попередник [5], ідарубіцин та епірубіцин. За фізико-хімічними характеристиками доксорубіцин є водорозчинною сполукою оранжево-червоного кольору (за нейтрального рН) і характеризується світлочутливістю [2].

Його структура складається з двох основних частин: агліконової та цукрової (рис. 1.1) [6]. Аглікони представлені тетрациклічним кільцем з прилеглими групами хінону-гідрохінону, метокси-підстановкою, карбонільною групою та коротким бічним ланцюгом. Цукрова складова – даунозамін (3-аміно-2,3,4-тридезоксид-L-фукоза) – приєднана до аглікону глікозидним зв'язком і відіграє значну роль у взаємодії препарату з біомолекулами [1].

Після внутрішньовенного введення доксорубіцин швидко розподіляється в організмі. Як показують фармакокінетичні дослідження, його розподіл має багатофазний характер. Спочатку клітини його швидко

захоплюють (напіврозподіл становить 3-5 хв), тоді як виведення з тканин відбувається значно повільніше (до 36 годин) [1].

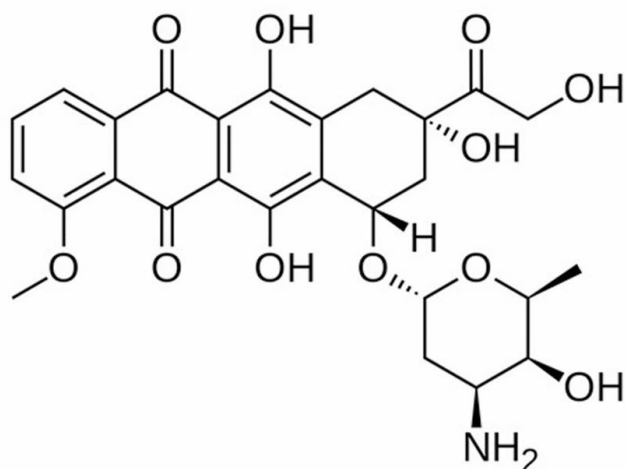


Рис. 1.1. Структурна формула доксорубіцину [7]

Доксорубіцин проникає у клітини шляхом пасивної дифузії, при цьому внутрішньоклітинні концентрації суттєво перевищують позаклітинні. Додатково він зв'язується з плазмовими білками, а вільний внутрішньоклітинний доксорубіцин рівномірно розподіляється між органами, зокрема лісозомами, апаратом Гольджі та мітохондріями. Найбільші його кількості накопичуються в печінці, кістковому мозку та лейкоцитах. Вищезгадані властивості пояснюються ліпофільними властивостями доксорубіцину й здатністю до інтеркаляції ДНК. Попри це, препарат не проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр [1].

Хімічна модифікація (біотрансформація) доксорубіцину відбувається в печінці з утворенням основного метаболіту - доксорубіцинолу. Подальші перетворення включають гідроліз глікозидних зв'язків, диметилування та кон'югацію з сульфатами або глюкуронідами, що сприяє його виведенню з організму. У більшості випадків агрегати препарату виявляються рідко і в дуже мізерних концентраціях.

Виведення препарату здійснюється переважно через печінку і жовч, тоді як нирковий шлях має другорядне значення. Приблизно 50 % введеної дози

виводиться з жовчю протягом 5–7 днів, і лише 5–12 % — із сечею протягом 5 днів, з яких близько 3 % припадає на метаболіти [1].

Протипухлинна дія препарату реалізується через декілька взаємопов'язаних механізмів. Основним із них є інтеркаляція в ДНК, що порушує структуру подвійної спіралі та блокує процеси реплікації і транскрипції.

Окрім цього, доксорубіцин інгібує топоізомеразу II, яка бере участь у розкручуванні ДНК під час поділу клітини. Це призводить до накопичення розривів ДНК і, за відсутності ефективної репарації, запускає механізми клітинної загибелі [1, 7]. Цей процес пов'язаний із активацією АМФ-активованої протеїнкінази (АМРК) – ключового сенсора енергетичного стану клітини, що у відповідь на окисдаивний стрес [7] та пошкодження ДНК призводить до пригнічення синтезу макромолекул і запускає апоптотичні механізми. Додатково активуються сигнальні шляхи, пов'язані з АМРК, р53, JNK та mTOR [4], що посилює апоптоз пухлинних клітин і порушує їх метаболічну активність [3].

Окисдаивний стрес виконує неабияку роль у цитотоксичній дії доксорубіцину. Оскільки препарат вступає в окисно-відновні реакції за участю іонів заліза, у результаті утворюються гідроксильні радикали та інші високореактивні сполуки [7]. Утворені молекули змінюють структуру нуклеїнових кислот, білків та ліпідів, які є в складі клітинних мембран, що призводить до порушень клітинної цілісності та функцій клітини. Поєднання і ДНК-ушкоджень, і окисдаивного стресу визначає загальну цитотоксичність препарату [4].

Разом із високою протипухлинною ефективністю доксорубіцин викликає розвиток різних побічних реакцій. До найбільш поширених належать загальна втома, алопеція, нудота і блювання, виразки в ротовій порожнині, а також пригнічення функції кісткового мозку і підвищення ризику розвитку вторинних злоякісних новоутворень. У разі екстравазації можливий розвиток

тяжких виразкових уражень і некрозу тканин, які з часом лише погіршуються [8].

Найбільш серйозним та дослідженим побічним ефектом препарату вважається його кардіотоксичність. Розвиток цього побічного ефекту найчастіше пов'язують із підвищенням оксидативного стресу, зниженням експресії кардіоспецифічних генів та індукцією апоптозу кардіоміоцитів.

До того ж, в літературі вказують про поділ на гострі й хронічні кардіотоксичні ефекти. Гострі прояви виникають протягом декількох днів після введення препарату і проявляються оборотними аритміями, міоперикардитом та дисфункцією лівого шлуночка [4, 9]. Тоді як хронічна, або її ще називають пізня через те, що вона проявляється пізніше, кардіотоксичність призводить до розвитку незворотної кардіоміопатії, серцевої недостатності, ризик летальності після якої дуже високий [1, 9].

Окремо слід відзначити дискусійність застосування доксорубіцину у поєднанні з гіпербаричною оксигенотерапією (ГБО). ГБО підвищує насичення тканин киснем і використовується для покращення загоєння та зменшення гіпоксії [10]. Проте експериментальні дані щодо комбінованого застосування з доксорубіцином залишаються суперечливими: в одних дослідженнях описано посилення токсичності, в інших — суттєвого негативного ефекту не виявлено. Вважається, що після повного виведення препарату ГБО є відносно безпечною, однак це питання потребує подальшого вивчення [10, 11].

Токсична дія доксорубіцину спостерігається не тільки для серцево-судинної системи. Значні ураження стосуються печінки, де препарат інтенсивно метаболізується й накопичується, як вже було зазначено. У процесі метаболізму утворюється велика кількість вільних радикалів, що спричиняють оксидативне ушкодження гепатоцитів, порушення енергетичного обміну та активацію запальних реакцій. Такі процеси значно підвищують рівень печінкових ферментів і сприяють розвитку медикаментозного гепатиту.

Також виявлено шкідливий вплив препарату на нирки. Доксорубіцин ушкоджує гломерулярні подоцити та порушує функцію мітохондрій у клітинах

нефрону. Побічні ефекти проявляються протеїнурією, зниженням фільтраційної здатності нирок, а в тяжких випадках – розвитком хронічної ниркової недостатності. Крім того, доксорубіцин опосередковано впливає на центральну нервову систему й спричиняє когнітивні порушення, які пов'язані з індукцією запальних цитокінів і оксидативним стресом [1].

Таким чином, попри високу ефективність і багатокомпонентний механізм дії, клінічне застосування доксорубіцину суттєво обмежується його системною токсичністю, насамперед кардіотоксичністю, а також ураженням інших органів і систем.

У зв'язку з цим актуальним залишається дослідження факторів, що обмежують застосування доксорубіцину, а також пошук нових підходів, спрямованих на підвищення його біодоступності та селективної доставки препарату.

1.2. Біодоступність доксорубіцину та підходи до її підвищення

Розвитком кардіо- та інших токсичних ефектів [7], про які вже йшлося, не вичерпується список ефектів та властивостей доксорубіцину, що визначають його біодоступність – частку введеної дози, що реально потрапляє в кров і здатна діяти. Рівень біодоступності залежить від способу введення препарату, фізико-хімічних властивостей молекули доксорубіцину, а також систем його розподілу та метаболізму.

Відомо, що доксорубіцин є амфіфільною молекулою з позитивним зарядом, що обмежує його здатність до пасивної дифузії крізь мембрани клітин. Навіть попри те, що препарат проникає в клітини, ефективність цього є низькою.

Іншим обмежуючим чинником є те, що доксорубіцин виступає субстратом транспортерів множинної лікарської резистентності (MDR), таких як Р-глікопротеїн, білок резистентності до раку молочної залози та білки,

пов'язані з MDR (наприклад, MRP). Їхня надекспресія у клітинах призводить до активного виведення препарату з цитозолу, зниження його внутрішньоклітинної концентрації та, відповідно, терапевтичної ефективності [12].

Не менш важливими обмеженнями використання доксорубіцину, що пов'язані з його фармакокінетикою, є швидке системне виведення і неспецифічний розподіл у тканинах. Після внутрішньовенного введення препарат швидко накопичується в печінці, селезінці та серці, що вказує на недостатнє накопичення у пухлинній тканині. Неселективний розподіл зумовлює розвиток дозозалежної токсичності, насамперед це стосується кардіотоксичних ефектів, механізми яких пов'язані з утворенням активних форм кисню, порушенням мітохондріальної функції та індукцією апоптозу кардіоміоцитів. Внаслідок цього неможливим є підвищення системної дози препарату для досягнення ефективної концентрації в пухлинній тканині [13].

Для вільного доксорубіцину також характерними є низька розчинність та відсутність оральної форми введення, яка була б найменш інвазивною, економічно ефективною та безболісною. Враховуючи всі прогалини препарату, сучасні дослідження спрямовані на пошук альтернативних підходів щодо цільової доставки препарату, підвищення його ефективності дії та зменшення побічних ефектів. Використовують різноманітні системи доставки препарату такі, як ліпосомальні, полімерні, білкові носії [14] або гідрогелі, які, з одного боку, транспортують та контролюють його поведінку в організмі. А з іншого - подовжують час циркуляції препарату в кровотоці та забезпечують селективність дії за рахунок так званого EPR-ефекту, тобто ефекту покращеного проникнення в пухлинні клітини та його затримання [15].

Ліпосомальні форми доксорубіцину, зокрема пегільовані ліпосоми (ПЕГ) розміром 100-200 нм, показують пригнічення швидкості росту пухлини в різних моделях раку, покращення загальної виживаності організму та якості життя порівняно з традиційним лікуванням доксорубіцином. Інкапсуляція доксорубіцину в ліпосоми дозволяє уникнути швидкого кліренсу з кровотоку

та сприяє пасивному накопиченню препарату в пухлинній тканині, який реалізується через наявність дефектних судин у пухлинах [14]. Проте ПЕГ-покриття сприяє зменшенню абсорбції білків та, відповідно, впливає на ефективність доставки. А от часткове або контрольоване вивільнення ПЕГ із поверхні ліпосом після досягнення цільової ділянки покращує доставку препарату. У сучасних дослідженнях розробляються таргетні ліпосомальні системи, зокрема з кон'югацією глутатіону або антитіл, що спрямовані на підвищення селективності доставки препарату. Описані підходи є перспективними, але їх клінічна ефективність потребує подальших досліджень.

Полімерні наночастинки теж широко досліджують як ефективних носіїв молекули доксорубіцину, експерименти проводять на мишах. Біодеградабельні полімери на основі хітозану та декстрану з доксорубіцином демонструють подовжену виживаність організмів, причому 50 % із них залишалося живими на 90-й день. Для порівняння, усі дослідні тварини при такому ж введенні вільного препарату померли до 60-го дня, і лише 25 % при введенні декстран- кон'югату вижили до 90-го дня [16]. Дослідження також показало, що наночастинки хітозану, завантажені доксорубіцином, значно пригнічували ріст пухлини та подовжували виживання мишей порівняно з вільним доксорубіцином [16]. Важливо зазначити, що в обох дослідженнях спостерігалось мало або взагалі не спостерігалось токсичності у мишей, які отримували наночастинки, завантажені доксорубіцином.

Ще одним перспективним засобом підвищення біодоступності доксорубіцину є полімерні міцели. Вони мають кілька переваг порівняно з іншими нанорозмірними системами доставки препаратів, такими як менший розмір, що важливо для підшкірного введення або екстравазації з кровоносних судин та накопичення в тканинах пухлин [16]. Застосування полімерних міцел дозволяє зменшити виведення доксорубіцину транспортними білками множинної лікарської резистентності та підвищити його внутрішньоклітинне накопичення. Особливо це грає роль при розвитку лікарської резистентності

пухлинних клітин до хіміотерапії [12, 16]. Також ці наносистеми, здатні найчастіше містити в своїй структурі ПЕГ–доксорубіциновий кон'югат та інкапсульований куркумін, показують значно більший протипухлинний ефект у порівнянні з комбінованим лікуванням вільними препаратами або наночастинкою, що містить лише доксорубіцин.

Попри те, що доксорубіцин традиційно не застосовується для введення перорально, що пов'язано із низькою біодоступністю, сучасні дослідження описують стратегії до її підвищення за допомогою поверхнево модифікованих полімерних наночастинок. Зазначені системи доставки забезпечують захист препарату від деградації в шлунково-кишковому тракті, а також зменшують активність транспортерів виведення (MDR, P-gp), що обмежують його всмоктування [15].

Для лікування пухлин, пов'язаних з кістками, особливо проблемним є внутрішньовенне введення доксорубіцину, що ускладнює лікування, тому сьогодні використовують системи доставки у вигляді гідрогелів, які здатні локально лікувати кісткові пухлини, запобігаючи потраплянню препарату до інших тканин організму [1]. Дослідження показують, що шляхом включення доксорубіцину в гідрогелі, ріст клітин різних форм раку значно зменшується, а також різні побічні ефекти, які часто спостерігаються при використанні вільного доксорубіцину. Одним із можливих пояснень є те, що значно менше препарату потрапляє до інших органів, оскільки він постійно вивільняється лише невеликими порціями. Останнє мінімізує побічні ефекти.

Альтернативними носіями доксорубіцину вважають екзосоми – везикули розміром 30-200 нм, які при завантаженні доксорубіцином пригнічують ріст пухлин більш ефективно, ніж вільний препарат, і характеризуються нижчою кардіотоксичністю, що пов'язують з обмеженим проникненням у тканину міокарда. Окрім цього, досліджуються магнітні наночастишки як носії доксорубіцину, які керовано спрямовують препарат у пухлину за допомогою зовнішнього магнітного поля. Такі системи демонструють рН-чутливе вивільнення препарату та підвищену цитотоксичність у кислому середовищі

пухлин, а їх поєднання з локальним нагріванням додатково підсилює протипухлинний ефект. Попри перспективність, більшість таких підходів наразі перебуває на стадії доклінічних досліджень.

Таргетна доставка доксорубіцину за допомогою специфічних молекул, антитіл, пептидів дозволяє не лише підвищити його біодоступність, але й суттєво знизити системну токсичність, забезпечити селективну взаємодію систем доставки, що сприятиме підвищенню терапевтичного індексу препарату [14, 16].

Незважаючи на значні переваги наведених систем доставки, їх ефективність у клінічних умовах не завжди повністю відповідає результатам, отриманим у доклінічних дослідженнях. Слід враховувати гетерогенність пухлинної тканини, варіабельність ефекту підвищеної проникності та затримки, а також індивідуальні особливості організму пацієнтів. З огляду на це особливого значення набувають підходи, які пов'язані з використанням природних транспортних систем організму, зокрема білків плазми крові, які забезпечують більш передбачуваний розподіл і пролонговану циркуляцію лікарських засобів.

1.3. Сироватковий альбумін як білковий носій лікарських сполук

Плазмові білки крові, зокрема сироватковий альбумін, відіграють важливу роль у транспорті різних лікарських речовин, що надходять в організм. Його висока частка в плазмі, структурна стабільність і велика кількість гідрофобних та іонних сайтів зв'язування забезпечують ефективне зв'язування молекул різної природи. У результаті альбумін переносить як ендogenous, так й екзогенні сполуки, включно з протипухлинними препаратами.

Частка сироваткового альбуміну в плазмі становить близько 55–60 %, що свідчить про його роль у підтриманні гомеостазу та перенесенні різних біологічно активних речовин [17, 18]. Він синтезується в гепатоцитах. Білок

добре розчинний у воді, зберігає стабільність у широкому діапазоні рН та температур, а також характеризується тривалим періодом напіввиведення. У людини він становить 19 діб. Такі властивості зумовлюють довготривалу циркуляцію альбуміну в кровотоці. У різних працях також зазначається, що альбумін транспортує жирні кислоти, гормони, вітаміни, іонів металів і лікарські засоби різної хімічної природи [18, 19]. Водночас висока концентрація білка в плазмі формує численну кількість зв'язувальних сайтів, що здатні впливати на фармакокінетику багатьох терапевтичних засобів.

За структурою сироватковий альбумін є глобулярним білком, який складається з трьох подібних доменів, поділених на субдомени А і В. Така будова формує кілька гідрофобних кишень і функціональних ділянок, відомих як сайти Судлоу I та II. Вони залучені до зв'язування лікарських препаратів. Завдяки вищезазначеним ділянкам альбумін вибірково та оборотно взаємодіє з лігандами [18]. Власне, ця оборотність, як вважають, є важливою умовою реалізації транспортної функції білка.

Альбумін як білковий транспортер утворює відносно стабільні, але динамічні комплекси з низькомолекулярними сполуками. При цьому препарат не тільки транспортується, а й поступово вивільняється. Такий механізм зумовлює більш рівномірний розподіл та зниження токсичних ефектів тих чи інших препаратів [17, 18].

Молекула сироваткового альбуміну не бере безпосередньої участі у метаболізмі ксенобіотиків, але регулює частку вільного препарату в крові. Лише незв'язана з білками частина лікарської речовини є доступна ферментам печінки, насамперед системи цитохрому Р450, які проводять першу фазу метаболізму. Ступінь зв'язування впливає на метаболічний кліренс та тривалість циркуляції лікарських засобів в організмі.

Альбумін-лігандні комплекси нерідко описують як своєрідне депо лікарських речовин у кровотоці. Вони поступово вивільняють активну сполуку, що, як правило, знижує пікові концентрації препарату та зменшує токсичні ефекти [18].

Також альбумін бере участь у транспорті через біологічні бар'єри, зокрема гематоенцефалічний бар'єр. Хоча проникнення білка через ГЕБ обмежене, описано рецептор-опосередковані механізми транспорту за участю неонатального Fc-рецептора (FcRn) та глікопротеїну gp60 [18].

Взаємодія з Fc-рецептором підтримує тривалий період напіввиведення альбуміну. Це запобігає його деградації після ендоцитозу та повертає білок назад у системний кровотік. У результаті цього механізму альбумін довше циркулює в організмі, а пов'язані з ним препарати довше залишаються в крові та мають вищу біодоступність [18].

Цікавим та водночас дискусійним є питання накопичення сироваткового альбуміну в пухлинних тканинах. Найчастіше це пояснюють ефектом підвищеної проникності та затримки (EPR-ефект), характерним для пухлинних судин. Крім того, значення може мати активний транспорт альбуміну через альбумін-зв'язувальний рецептор ендотелію (gp60) і взаємодія з білками пухлинного мікрооточення [19]. Зокрема, кислий секретований білок та багатий на цистеїн (SPARC), здатен добре зв'язуватися з альбуміном. Високий рівень експресії SPARC у пухлинному мікрооточенні асоціюється із більшим накопиченням альбумін-зв'язаних препаратів і впливає на ефективність терапії [20, 34].

У сучасних дослідженнях розвивається напрям створення альбумінових наноструктур, включаючи наночастинки та кон'югати типу «білок–ліганд» [20]. Такі системи стабільні у фізіологічних умовах, сприяють контрольованому вивільненню препаратів, є нетоксичними та біосумісними [20, 21]. Прикладом успішного застосування альбуміну як наноносія є препарат наб - паклітаксел (Абраксан) – наночастинкова форма паклітакселу на основі альбуміну. Він краще проникає в пухлини, накопичується там та знищує їх і показує знижений рівень токсичності порівняно з традиційними формами. Водночас результати його застосування залежать від клінічних умов і не завжди є однозначними.

Альбумінові системи доставки отримують за допомогою десольватації, термічної агрегації, ковалентної кон'югації та самозбірки комплексів за рахунок нековалентних взаємодій. Метод обирають залежно від фізико-хімічних властивостей препарату та поставленої терапевтичної задачі [22]. Важливо посприяти збереженню нативної структури альбуміну, оскільки її порушення призведе до змін зв'язування з рецепторами, фармакокінетичних характеристик та імуногенності систем.

Сироватковий альбумін як природний транспортер має декілька переваг над застосуванням синтетичних наноматеріалів. Зокрема, це його біосумісність, висока розчинність та стабільність, низька токсичність, відсутність потреби в складних модифікацій молекули для уникнення небажаної імунної відповіді. Проте його використання також обмежується. Зокрема, конкуренція зв'язування з ендogenous лігандами такими, як жирні кислоти, гормони, білірубін, а також зміни його концентрації при патологічних станах можуть суттєво впливати на ефективність доставки [17, 21].

Загалом альбумін вважається одним з найважливіших переносників у наномедицині, особливо в онкології. При створенні систем доставки протипухлинних препаратів дослідники особливо зосереджуються на взаємодії альбуміну з антрациклінами, зокрема доксорубіцином. Те, що доксорубіцин може зв'язуватися з альбуміном, значно покращує його доставку та селективність дії, впливає на біодоступність та ступінь токсичності. Тому важливо детально розібратися в тому, як саме відбувається ця взаємодія на молекулярному рівні для підтвердження ефективності й доречності використання альбуміну у системах доставки таких лікарських засобів.

1.4. Молекулярні основи формування комплексів білок–ліганд

Взаємодія білків з низькомолекулярними лігандами значною мірою визначає фармакокінетику, біодоступність та розподіл лікарських засобів в

організмі [23]. Альбумін як транспортний білок утворює комплекси з лігандами різної природи завдяки ковалентним і нековалентним взаємодіям, а також у результаті застосування технологій злиття білків [24].

Ковалентне зв'язування передбачає утворення хімічно стабільного зв'язку між молекулою ліганду та амінокислотними залишками білка. Найбільш реакційноздатним центром альбуміну є Cys34 із вільною тіольною групою, розташованою на поверхні білка. У ковалентному зв'язуванні також беруть участь аміногрупи лізину (Lys190, Lys195, Lys199), гідроксильні групи тирозину та інші нуклеофільні центри [18]. Ковалентні зв'язки утворюються шляхом нуклеофільного приєднання, утворення амідних або тіоефірних зв'язків, а також за участю метаболічно активованих форм, зокрема глюкуронідів. Така взаємодія зазвичай незворотна або повільно оборотна й продовжує циркуляцію лікарської сполуки. Разом з тим, ускладнює її вивільнення.

Нековалентні взаємодії належать до слабших взаємодій, але є ефективним механізмом утворення довготривалих біотерапевтичних засобів [25]. До них належать гідрофобні, електростатичні взаємодії, водневі зв'язки та ван-дер-ваальсові сили. Гідрофобні взаємодії виникають між неполярними ділянками ліганда та гідрофобними кишнями білка і стабілізують комплекс у водному середовищі. Електростатичні взаємодії виникають між зарядженими групами білка та ліганда і залежать від рН та іонної сили середовища. Водневі зв'язки забезпечують специфічність і додатково стабілізують комплекс через донорно-акцепторні взаємодії. Молекули ліків оборотно зв'язуються з альбуміном завдяки цим механізмам, що забезпечує транспортну функцію білків плазми [25].

Прикладом нековалентної взаємодії є зв'язування антрациклінових антибіотиків з альбуміном, зокрема доксорубіцину. Молекула є амфіфільною і містить планарне антрациклінове ядро та кілька полярних функціональних груп, тому вона утворює комплекси за участю кількох типів слабких взаємодій. Зв'язування відбувається переважно у гідрофобних кишнях білка (сайтах

Судлоу), де ароматична система молекули стабілізується завдяки π - π стекінговим взаємодіям із неполярними амінокислотними залишками білка [23]. Електростатичні взаємодії також важливі, оскільки за фізіологічних умов доксорубіцин частково протонований, а альбумін містить як позитивно, так і негативно заряджені ділянки, тому вони взаємодіють між собою [26]. Дослідження показують, що іонна сила середовища та електроліти істотно впливають на ступінь зв'язування, що підтверджує внесок електростатичної складової в енергію взаємодії [27].

Дані щодо локалізації сайтів зв'язування та сили взаємодії доксорубіцину з альбуміном частково суперечать один одному. Різні дослідження вказують на домінування зв'язування як у сайті Судлоу I, так і в сайті Судлоу II; це пов'язують із різними експериментальними умовами, концентраціями ліганду, а також використанням різних фізико-хімічних методів [23]. Варіабельність констант зв'язування, отриманих різними методами, показує залежність афінності від умов середовища, зокрема pH, іонної сили, наявності конкурентних лігандів.

Формування комплексу супроводжується статичним гасінням флуоресценції Trp-214, що вказує на утворення стабільного комплексу [28]. Афінність зв'язування є помірною (10^4 – 10^5 M⁻¹) [29]; це характерно для транспортних білків і підтримує динамічну рівновагу між зв'язаною та вільною формами препарату [30]. Термодинамічні параметри взаємодії ($\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$) показують, що процес є спонтанним і визначається переважно гідрофобними взаємодіями, а ентальпійний внесок (ΔH) пов'язаний із водневими та ван-дер-ваальсовими взаємодіями [23].

Зв'язування супроводжується незначними конформаційними змінами альбуміну [31] без втрати його глобальної стабільності. Стехіометрія зазвичай становить 1:1, хоча при високих концентраціях препарату можливе залучення менш специфічних ділянок білка [32]. Для антрациклінів така модель зв'язування є типовою і пов'язана з просторовою організацією центрів зв'язування альбуміну (рис.1.2).

Утворення комплексу зменшує частку вільного препарату в плазмі, що знижує швидкість елімінації та токсичність, одночасно формуючи депо препарату з поступовим вивільненням [33].

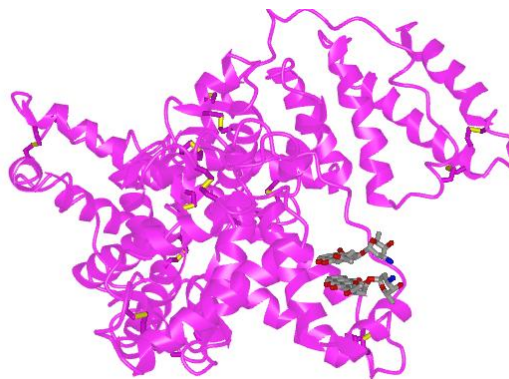


Рис. 1.2. Стехіометрія зв'язування ідарубіцину з сироватковим альбуміном людини

Інший підхід базується на технології злиття білків і передбачає генетичне об'єднання альбуміну з терапевтичним білком або пептидом в єдину рекомбінантну молекулу. Ключову роль відіграє пептидний лінкер, який визначає орієнтацію доменів, їхню гнучкість і доступність для взаємодій. Через велику молекулярну масу альбуміну такі конструкції мають нижчий нирковий кліренс і довший період напіввиведення. Підхід дозволяє контролювати співвідношення компонентів, підвищує стабільність терапевтичних препаратів і зменшує частоту введення. Прикладами є альбіглутид для лікування пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу, а також альбумін-злиті фактори згортання крові, зокрема альбутрепенонаког-альфа для лікування тяжкої гемофілії, які демонструють подовжену циркуляцію в організмі та підвищену ефективність терапії [34].

Ковалентні, нековалентні взаємодії та технології злиття білків з альбуміном відрізняються механізмами та фармакокінетичними характеристиками [34]. Ковалентне зв'язування робить комплекс стабільним і подовжує циркуляцію препарату, але уповільнює вивільнення і ускладнює контроль фармакодинамічного ефекту. Нековалентні взаємодії, навпаки, дають

змогу альбуміну виконувати функцію носія, підтримуючи баланс між зв'язаною і вільною формами препарату. Це важливо для оптимальної біодоступності та контрольованого розподілу в організмі [35]. Технологія злиття білків відрізняється тим, що створює одну рекомбінантну молекулу, у якій фармакокінетика визначається вже на рівні первинної структури білка [36]. Цей підхід подовжує період напіввиведення і зменшує частоту введення, але потребує ретельного дослідження та контролю стабільності отриманих конструкцій.

Таким чином, результати огляду літератури підтверджують доцільність пошуку, розробки та застосування альтернативних систем доставки лікарських засобів, зокрема для доксорубіцину як протипухлинного лікарського засобу, який у вільній формі має низьку біодоступність, неспецифічно розподіляється та є токсичним, що обмежує ефективність і безпечність терапії онкологічних захворювань.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Опис використаних речовин та обладнання

У роботі було використано наступні реактиви та матеріали: концентрат доксорубіцину (Ebewe Pharma, Австрія), 20 % розчин альбуміну (БІОФАРМА ПЛАЗМА, Україна), гліцин, хлорид натрію, хлорид калію, гідрофосфат натрію, дигідрофосфат калію (Sigma-Aldrich, Німеччина), 25 % розчин глутаральдегіду, сорбент Sephadex G-25, етиловий спирт, діалізний мішок молекулярної маси 11 кДа (Sigma-Aldrich, Німеччина), клітинні лінії U-373, НЕК-293, 3- (4,5 диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід (МТТ-реагент), DMSO, SDS, середовище RPMI-1640, FBS, трипсин, антимікатин.

У процесі виконання роботи було застосовано наступне лабораторне обладнання: витяжна шафа, спектрофотометр СФ-2000, хроматограф BIO-RAD Biologic LP (Bio-Rad, США), флуориметр PTI (Photon Technology International, США), термостат H2P-168 Incubator-Thermostat (Haier Biomedical, Китай), CO₂-інкубатор New Brunswick GALAXY 48S Incubator (Eppendorf, Німеччина), лічильник клітин Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, США), бокс біологічної безпеки II класу Esco Airstream (ESCO Lifesciences, Сінгапур), мікропланшетний рідер Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США), проточний цитофлуориметр DxFLEX (Beckman Coulter, США).

2.2. Отримання комплексів доксорубіцину з альбуміном

Комплекси людського сироваткового альбуміну з доксорубіцином отримували з використанням різних типів взаємодії – нековалентних та ковалентних.

Нековалентні комплекси отримували шляхом змішування людського сироваткового альбуміну (1 %) з розчином доксорубіцину (2 мг/мл) в різних молярних співвідношеннях [25, 37]. Інкубацію проводили за кімнатної температури протягом 1 години у фосфатному буферному розчині з рН 7.4. Після інкубації отримані розчини аналізували різними методами.

Ковалентні комплекси альбуміну з доксорубіцином отримували з використанням глутаральдегіду як зшиваючого агента [38]. Молекула глутаральдегіда взаємодіє з аміногрупами білка, зокрема залишками лізину альбуміну, з утворенням основ Шиффа ($-C=N-$), що забезпечує формування ковалентних міжмолекулярних і внутрішньомолекулярних зшивок і призводить до утворення стабільної тривимірної структури білка.

Для цього під витяжною шафою змішували розчин 2,5 % глутаральдегіду з 1 % розчином сироваткового альбуміну, робочі концентрації яких попередньо підбирали та використовували сталі на момент приготування зразків, інкубували протягом 30 хв за кімнатної температури, після чого додавали доксорубіцин в різних концентраціях та інкубували ще 30 хвилин. Реакцію зупиняли 1 М розчином гліцину, щоб інактивувати надлишок глутаральдегіду шляхом взаємодії з його альдегідними групами, зупинити подальше зшивання та зменшити токсичність системи.

Отримані комплекси очищували методом діалізу 24 години проти фосфатно-буферного розчину, рН 7.4 та використовували для подальших експериментів.

2.3. Фізико-хімічні методи аналізу комплексоутворення

Для підтвердження утворення комплексів та оцінки їх фізико-хімічних характеристик застосовували спектрофотометричні, флуориметричні методи та методи діалізу й хроматографії.

Спектрофотометричний аналіз проводили з використанням УФ-видимої спектрофотометрії. Спектри поглинання реєстрували в діапазоні довжин хвиль 260-500 нм у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см. Як контроль використовували відповідний буферний розчин з рН 7.4. Реєстрували спектри за допомогою спектрофотометра СФ-2000 розчинів вільного сироваткового альбуміну, вільного доксорубіцину та комплексів – нековалентних та ковалентних, – у різних молярних співвідношеннях їх компонентів [41].

Флуориметричний аналіз проводили з метою оцінки взаємодії альбуміну з доксорубіцином та її параметрів [41, 42]. Збудження здійснювали при довжині хвилі 275 нм, реєстрацію емісії проводили в діапазоні 294–440 нм за допомогою флуориметра РТІ. Вимірювання проводили при сталих умовах температури (298,15 К) та рН 7.4. Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували для розчинів альбуміну в присутності різних концентрацій доксорубіцину – 2 мкМ, 4 мкМ, 6 мкМ, 8 мкМ та 12 мкМ. Як контроль було взято спектр білка без доксорубіцину. Обробку та візуалізацію результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Felix GX.

Для визначення констант зв'язування та кількості центрів зв'язування використовували рівняння Стерна-Вольмера (2.1) та його логарифмічну форму (2.2):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q], \quad (2.1)$$

де F_0 – інтенсивність флуоресценції у відсутності доксорубіцину;

F - інтенсивність флуоресценції у присутності доксорубіцину;

K_{SV} – константа Стерна-Вольмера;

$[Q]$ – концентрація гасника.

$$\log \left(\frac{F_0 - F}{F} \right) = \log K_b + n \log [Q], \quad (2.2)$$

де K_b – константа зв'язування;

n – кількість сайтів зв'язування.

З метою додаткового підтвердження комплексоутворення згаданих вище компонентів, а також визначення кількості зв'язаного та вільного препарату, проводили хроматографічний аналіз. Для цього використали хроматограф BIO-RAD Biologic LP з УФ-детектором (280 нм), методику гелі-фільтраційної хроматографії та сорбент Sephadex G-25 [25]. Зразки нековалентного та ковалентного комплексів попередньо приготували з надлишковою кількістю доксорубіцину та профільтрували за допомогою мембранних фільтрів з розміром пор 0,22 мкм для видалення можливих механічних домішок. Як рухоми фазу використали фосфатно-буферний розчин з рН 7.4, елюцію та відмивку здійснювали в тому ж буфері. Швидкість потоку рухомої фази становила 2 мл/хв, а об'єм вихідних зразків – 0,5 мл. Детектування здійснювалось спектрофотометрично при довжині хвилі 280 нм. Ідентифікацію піків проводили шляхом порівняння піків досліджуваних комплексів та їх об'єму елюції, що обернено пропорційний їх гідродинамічному розміру, із розчином людського сироваткового альбуміну, приготованому у тій самій концентрації, що й у складі комплексів. Додатково фракції зразків аналізувались на СФ-2000 спектрофотометрично.

Для оцінки кінетики вивільнення доксорубіцину у складі нековалентних та ковалентних комплексів використовували метод діалізу [39, 40]. Досліджувані зразки з різними молярними співвідношеннями альбуміну до доксорубіцину поміщали у діалізні мішечки, молекулярна маса яких становила 11 кДа, та занурювали у фосфатно-буферний розчин з рН 7.4 і діалізували при

безперервному перемішуванню та 37 °C. Далі їх відбирали у різних часових інтервалах (0,5, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 24 год) з відновленням об'єму середовища свіжим буфером. Кількості вивільненого препарату аналізували шляхом визначення поглинання при 480 нм [39, 40], використовуючи попередньо побудовану калібрувальну залежність (див. Додаток А).

Ступінь вивільнення препарату розраховували як відношення кількості доксорубіцину, що перейшла у зовнішній розчин, до його початкового вмісту в досліджуваному зразку.

Усі експерименти проводили щонайменше у трьох повторях.

2.4. Визначення біологічної активності препарату *in vitro*

Для оцінки цитотоксичності кон'югатів був використаний метод визначення життєздатності клітин – МТТ-аналіз [43]. Метод заснований на здатності метаболічно активних клітин відновлювати жовтий барвник 3- (4,5 диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід (МТТ) до нерозчинного фіолетового формазану за участю мітохондріальних дегідрогеназ. Кількість утвореного формазану є пропорційно числу життєздатних клітин.

Клітини гліобластоми людини (U-373) висівали в 96-лунковий мікропланшет, приблизно 2×10^4 клітин на лунку (у 0,1 мл повного робочого середовища). Клітини інкубували за стерильних умов при 37 °C за 5 % CO₂. Після досягнення 80 % конфлюентності по 0,1 мл зразка в повному середовищі додавали у лунки планшета. Зразки, що вносились, були наступними: вільний альбумін в діапазоні концентрацій 0,3 – 0,001 мкМ, нековалентний комплекс, ковалентний комплекс та вільний доксорубіцин в такому ж діапазоні концентрацій. Для контролю також використовували лунки, що містили лише 0,1 мл повного робочого середовища (з клітинами), та порожні (бланкові) лунки. Кожен експеримент повторювали тричі. Після культивування протягом

24 год до лунок мікропланшета додавали 0,1 мл розчину МТТ концентрацією 5 мг/мл, після чого мікропланшети витримували протягом 4 год в інкубаторі в стерильних умовах при 37 °С за 5 % CO₂. Після інкубації в лунки додали попередньо приготований солюбілізаційний розчин, після чого мікропланшети інкубували на шейкері протягом 15 хв з перемішуванням на 200 об/хв, доки кристали формазану повністю не розчинилися. Оптичну щільність визначали в кожній лунці на довжині хвилі максимуму поглинання формазану 545 нм проти 620 нм за допомогою мікропланшетного рідера Multiscan FC. Рівень життєздатності клітин розраховували за наступною формулою:

$$\text{Життєздатність} = \frac{A_i}{A_0} * 100\%, \quad (2.3)$$

де A_i — середня оптична густина у лунках, що містять клітини та розчини зразків;

A_0 — це середня оптична густина в контрольних лунках, що містять лише клітини.

Для оцінки взаємодії досліджуваних зразків з клітинами та рівня їх внутрішньоклітинного накопичення використовували метод проточної цитофлуориметрії [44, 45]. Клітини U-373 висівали на 12-лункові планшети приблизно $0,5 \times 10^6$ клітин на лунку та інкубували при 37 °С у 5 % CO₂ до досягнення 70–80 % конфлюентності. Після цього клітини обробляли досліджуваними зразками (вільний альбумін, ковалентний комплекс, вільний доксорубіцин) у концентраціях 5 та 10 мкМ, за виключенням зразків альбуміну, в яких концентрація була зменшена ще вдвічі, протягом 30 хв. Після інкубації клітини промивали фосфатно-буферним розчином, вносили трипсин для відкріплення клітин та ресуспендували у середовищі для аналізу. Враховуючи власну флуоресценцію доксорубіцину, додаткове фарбування клітин не проводили. Далі клітини відбирали та центрифугували по 5 хвилин 3-4 рази, після чого ресуспендували в середовищі та вимірювали за допомогою

проточного цитофлуориметра DxFLEX з реєстрацією інтенсивності флуоресценції доксорубіцину у PE-каналі зі збудженням при 488 нм.

Аналіз включав послідовний гейтинг клітин: відбір цільової популяції за параметрами FSC-A/SSC-A, виключення клітинних агрегатів шляхом виділення одиничних клітин за співвідношенням FSC-A/FSC-Width, а також визначення рівня флуоресценції [44]. Порогове значення клітин, позитивних за вмістом доксорубіцину, визначали на основі рівня автофлуоресценції (бланк), негативного контролю (альбумін) та зразків з доксорубіцином.

2.5. Статистичне оброблення результатів

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми СФ-2000, Felix GX, LP Data View, CytExpert for DxFLEX.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка спектральних змін альбуміну при додаванні доксорубіцину

Для реєстрації спектрів альбуміну використовували розчини альбуміну з фіксованою концентрацією 2 мкМ. Концентрацію доксорубіцину в нековалентних та ковалентних комплексах варіювали в межах 2 – 12 мкМ. Як контроль використовували зразок альбуміну в тій же концентрації.

На рис. 3.1 наведено спектри HSA у складі нековалентного комплексу з DOX. Максимумом поглинання спостерігається при 280 нм, що відповідає ароматичним амінокислотам білка.

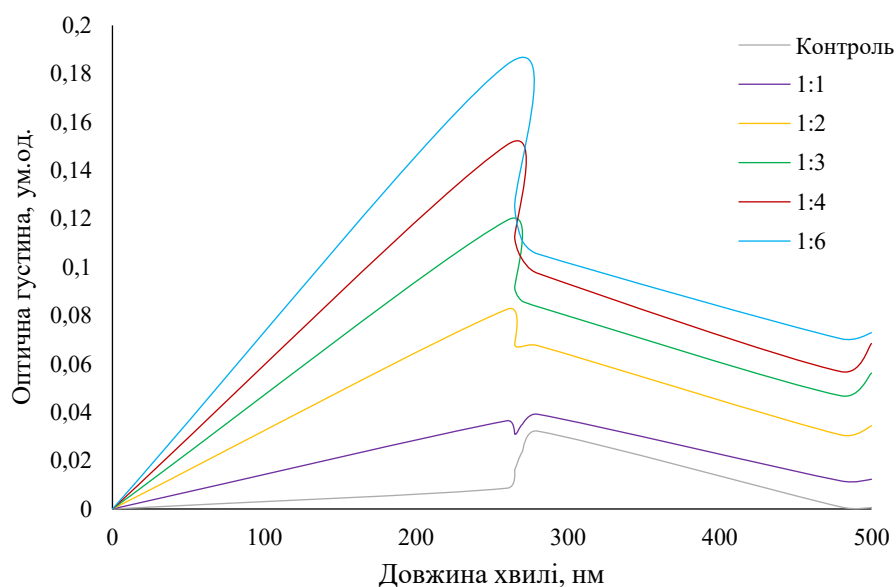


Рис. 3.1. УФ-спектри поглинання людського сироваткового альбуміну (2 мкМ) у фосфатному буфері за відсутності та за наявності препарату DOX при різних співвідношеннях компонентів у складі нековалентного комплексу

Із підвищенням концентрації DOX інтенсивність поглинання поступово збільшується (гіперхромний ефект), але положення максимуму практично не

зміщується. Така поведінка спектрів зумовлена як внеском самого доксорубіцину, так і його взаємодією з альбуміном.

На рис. 3.2 представлені спектри HSA у складі ковалентного комплексу. Вони також мають максимум близько 280 нм, однак інтенсивність сигналу для модифікованих зразків суттєво вища, ніж у нативного альбуміну. Це показує як процес зшивання впливає на спектральні характеристики білка. При збільшенні співвідношень компонентів – від 1:1 до 1:6, – також спостерігається поступове зростання інтенсивності максимуму поглинання, що відповідає гіперхромному ефекту.

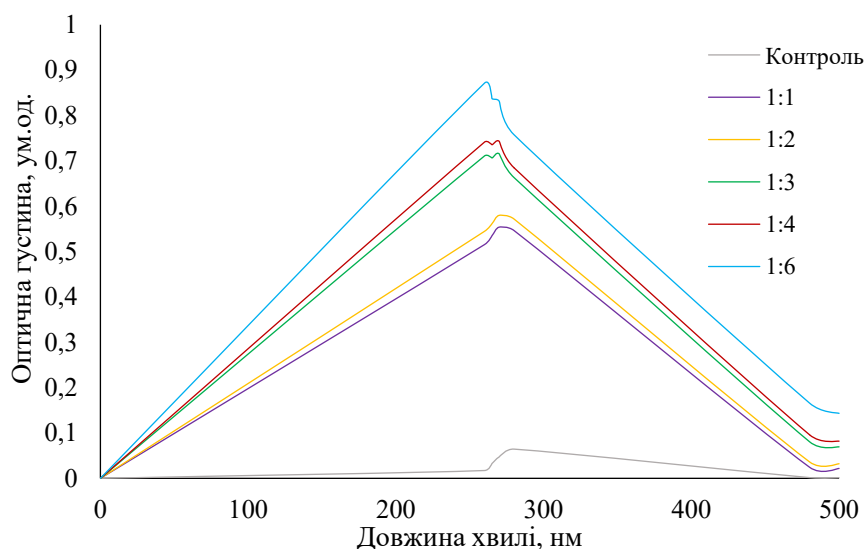


Рис. 3.2. УФ-спектри поглинання людського сироваткового альбуміну (2 мкМ) у фосфатному буфері за відсутності та за наявності препарату DOX при різних співвідношеннях компонентів у складі ковалентного комплексу

Водночас положення максимумів для зразків 1:1 та 1:2 практично не змінюється, що вказує на збереження хромофорних груп білка. Починаючи з вищих співвідношень (1:3, 1:4 та 1:6), спектри помітно розширюються, а форма піків змінюється. Такі зміни, ймовірно, пов'язані з порушенням мікрооточення ароматичних амінокислот і певною конформаційною перебудовою білка. Це узгоджується з очікуваним утворенням ковалентних

зв'язків між аміногрупами альбуміну та альдегідними групами глутаральдегіду.

При порівнянні спектрів нековалентних та ковалентних комплексів видно, що в обох випадках спостерігається зростання інтенсивності поглинання при збільшенні концентрації DOX. Однак для ковалентних комплексів характерні більш виражені зміни спектральних кривих, зокрема розширення максимумів та зміна їх форми, що свідчить про більш суттєві конформаційні зміни білка порівняно з нековалентною взаємодією. Аналогічні спектральні зміни описані в літературі для взаємодії «альбумін–лікарська сполука», що підтверджує узгодженість отриманих результатів та свідчить про подібний механізм взаємодії.

Оскільки УФ-спектрофотометрія не дозволяє однозначно виокремити внесок власного поглинання ліганду та змін, зумовлених комплексоутворенням, а також повністю охарактеризувати механізм та характер зв'язування, для подальшого дослідження взаємодії HSA з DOX доцільно застосувати флуориметричний метод.

3.2. Флуориметричний аналіз комплексоутворення

Даний експеримент було проведено з метою вивчення взаємодії компонентів комплексів головним чином через внутрішню флуоресценцію залишків триптофану (Trp-214), що присутній у сайті зв'язування DOX білка.

На рис. 3.3 та рис. 3.4 наведено результати флуориметричного дослідження взаємодії альбуміну з доксорубіцином у складі нековалентного та ковалентного комплексів за фіксованої температури 298,15 К. Як контроль було взято спектр білка без доксорубіцину.

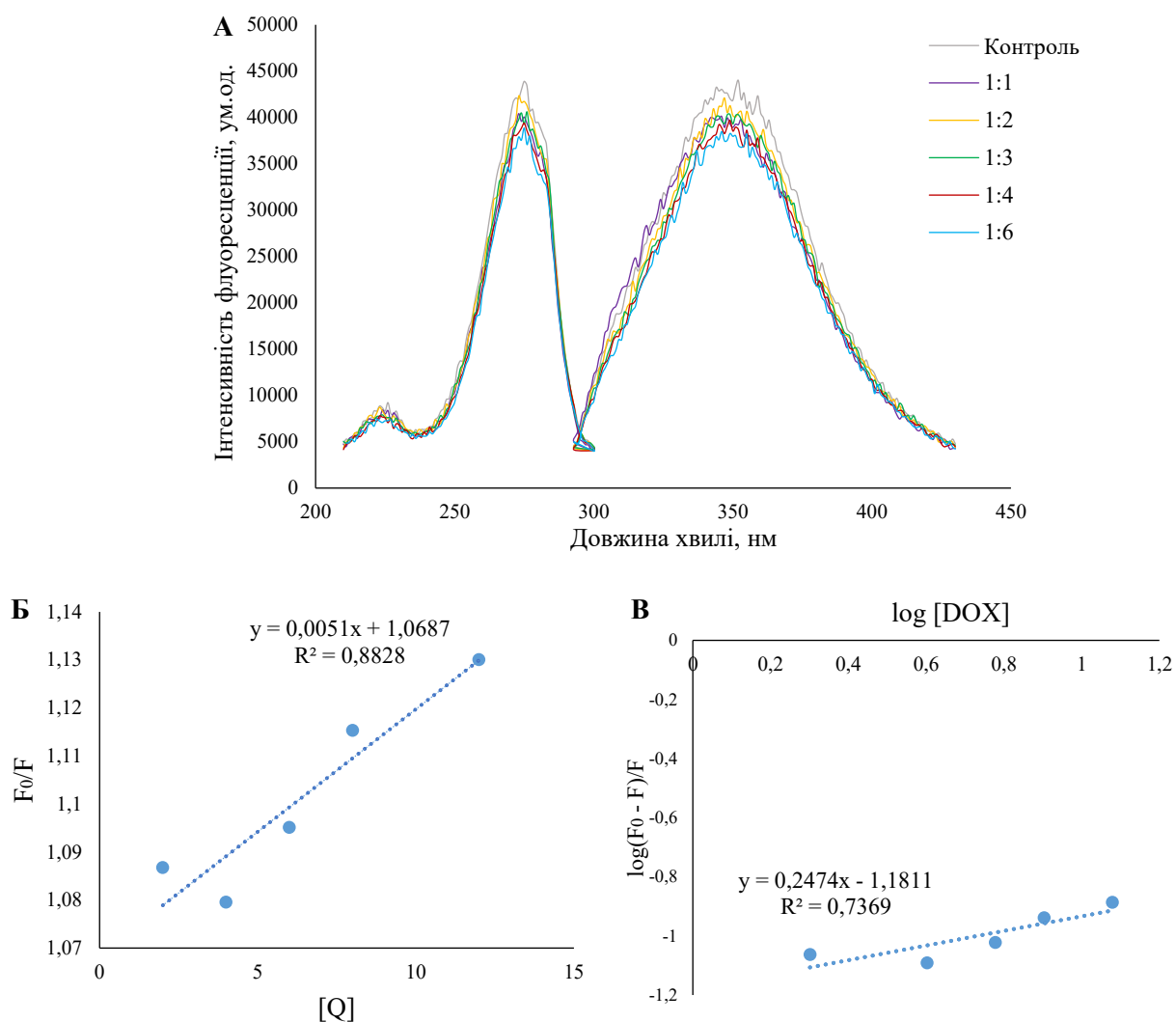


Рис. 3.3. Спектри флуоресценції збудження та емісії при 298,15 К (А) і графіки Стерна – Вольмера для взаємодії альбумін–доксорубіцин у складі нековалентного комплексу (Б, В)

За результатами, наведеними на рис. 3.3А та рис. 3.4А, спостерігається зменшення інтенсивності флуоресценції альбуміну у складі нековалентного та ковалентного комплексів зі збільшенням концентрації DOX, що свідчить про взаємодію DOX з HSA та гасіння флуоресценції Trp-214 в HSA.

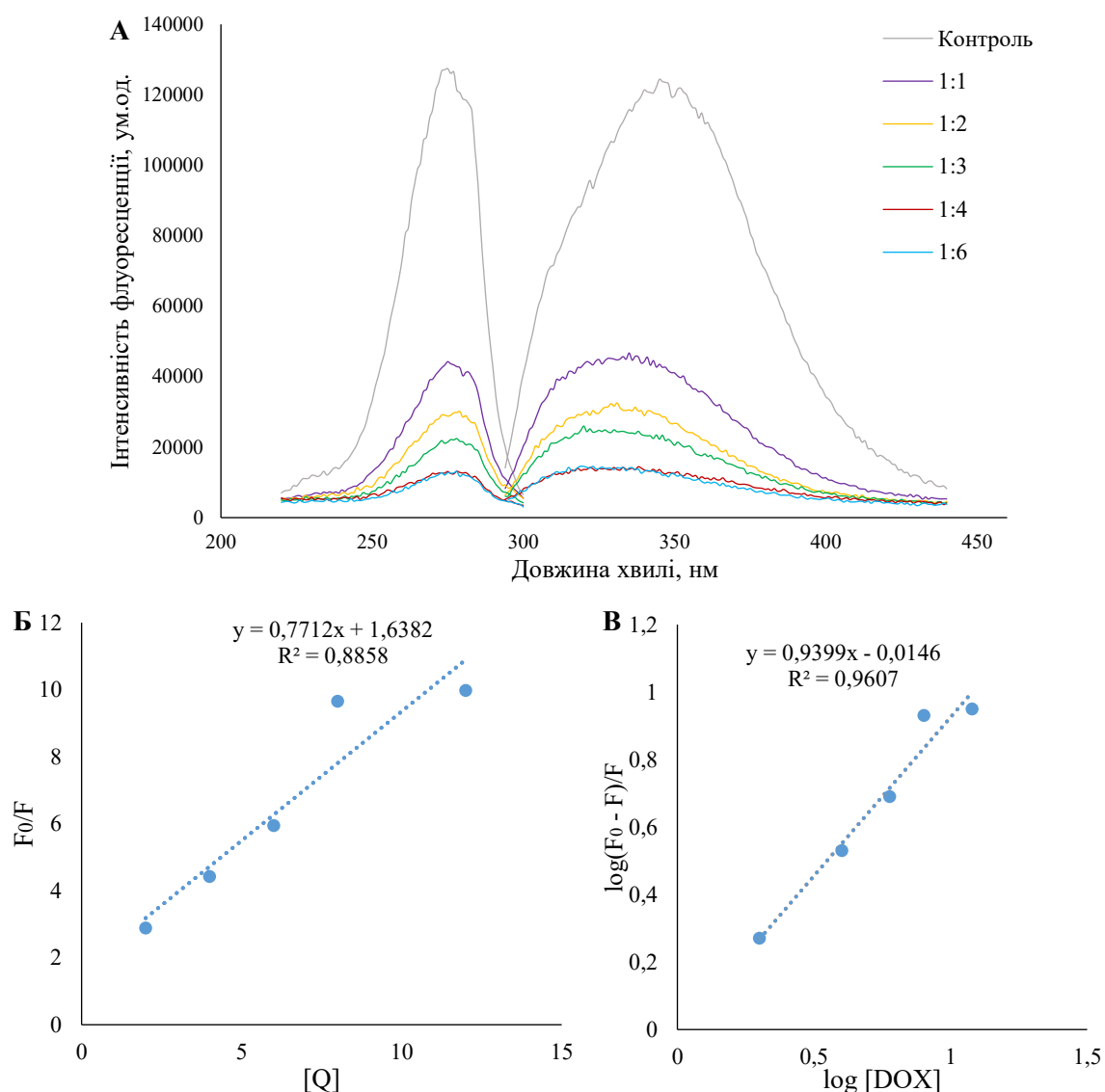


Рис. 3.4. Спектри флуоресценції збудження та емісії при 298,15 К (А) та графіки Стерн – Вольмера для взаємодії альбумін–доксорубіцин у складі ковалентного комплексу (Б, В)

Для кількісного аналізу процесу гасіння було використано рівняння Стерна-Вольмера (див. 2.1). На основі експериментальних даних було побудовано залежність F_0/F від концентрації доксорубіцину як гасника (рис.3.3Б, рис. 3.4Б). Лінійна апроксимація цієї залежності дозволила визначити значення констант гасіння K_{sv} (табл. 3.1). Параметри зв'язування визначали з використанням логарифмічної форми рівняння (див. 2.2). Побудова відповідної залежності (рис. 3.3В, рис. 3.4В) дозволила визначити

значення кількості сайтів зв'язування та констант зв'язування. Відповідні значення наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Параметри флуориметричного дослідження комплексоутворення
доксорубіцину з альбуміном
($M \pm m$; $n=3$)**

Комплекс	$K_{sv}(k_d)$, M^{-1}	n	$\log K_b$	K_b , M^{-1}
Нековалентний	$(5,10 \pm 0,36) \cdot 10^3$ **	$0,25 \pm 0,02$ **	$(-1,15) \pm 0,03$ *	$(6,60 \pm 0,49) \cdot 10^4$ *
Ковалентний	$(7,70 \pm 0,61) \cdot 10^5$	$0,94 \pm 0,05$	$(-0,02) \pm 0,01$	$(9,60 \pm 0,85) \cdot 10^5$

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ - порівняно з ковалентним комплексом

Для нековалентного комплексу встановлено відносно низькі параметричні значення, що може пояснюватися слабкою та оборотною взаємодією, за якої утворений комплекс є нестабільним та схильним до часткової дисоціації в умовах експерименту.

Для ковалентно модифікованої системи спостерігається суттєве збільшення значення константи зв'язування та наближення кількості ефективних сайтів до одиниці. Це ймовірно пов'язано з більш ефективною взаємодією препарату з білком, а також з формуванням стабільного комплексу з високим ступенем залучення доступних зв'язувальних центрів.

Порівняльний аналіз вказує на те, що ковалентна модифікація комплексу істотно підвищує здатність до зв'язування доксорубіцину з сироватковим альбуміном та стабільність утвореного комплексу. До того ж, така система характеризується практично незворотною взаємодією в умовах експерименту, що принципово відрізняє її від нековалентного варіанту. Отримані результати узгоджуються з літературними даними.

3.3. Аналіз комплексоутворення за результатами гель-фільтрації

Для додаткового підтвердження утворення комплексів сироваткового альбуміну з доксорубіцином було проаналізовано зразки вільного альбуміну, а також зразки, отримані при молярному співвідношенні компонентів 1:10 (20 мкМ : 200 мкМ) у складі нековалентних та ковалентних систем.

На рис. 3.5 представлено хроматографічні профілі всіх досліджуваних зразків.

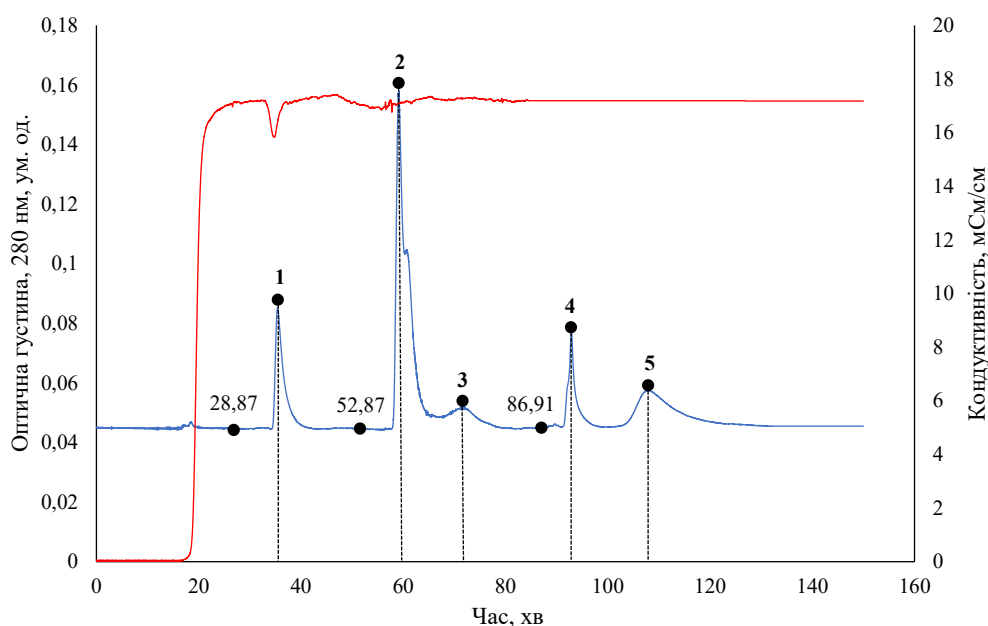


Рис. 3.5. Хроматограма розділення зразків на колонці Sephadex G-25 в 1 М фосфатному буфері, рН 7.4: 1 – зразок альбуміну, 2 – зразок ковалентного комплексу, 3 – вільний доксорубіцин, 4 – зразок нековалентного комплексу, 5 – вільний доксорубіцин

На хроматограмі видно три основні піки – пік альбуміну, пік ковалентного комплексу та нековалентного. Пік сироваткового альбуміну характеризується симетричною формою та елююється при $V_e = 9,54 \pm 0,45$ мл, що свідчить про однорідність білкового зразка та відсутність значної агрегації.

Пік ковалентного комплексу зміщений у зону менших об'ємів елюції (табл. 3.2), що вказує на збільшення гідродинамічного розміру частинок

унаслідок зв'язування доксорубіцину з альбуміном. Форма піка є видозміненою та має двогорбистий характер, що може свідчити про наявність кількох форм кон'югату або різного ступеня модифікації білка. При цьому спектрофотометричний аналіз підтвердив наявність доксорубіцину у відповідних фракціях у концентрації 45 мкМ, що вказує на комплексоутворення. Після основного піку спостерігається окремий пік при більшому об'ємі елюції (табл.3.2), який відповідає доксорубіцину, що не зв'язався.

Таблиця 3.2

**Об'єми елюції (V_e) альбуміну, його комплексів із доксорубіцином та вільного препарату (G-25)
($M \pm m$; $n=3$)**

Зразок	Альбумін	Нековалентний комплекс	Вільний доксорубіцин	Ковалентний комплекс	Вільний доксорубіцин
Об'єм елюції, мл	$9,54 \pm 0,45$	$6,68 \pm 0,35$ *	$37,26 \pm 1,50$	$8,62 \pm 0,48$ *	$25,36 \pm 1,03$
Утворення комплексу	-	Ні	-	Так	-

* – $p < 0,05$ (порівняно з альбуміном)

У випадку нековалентної системи пік має форму, подібну до піка сироваткового альбуміну без доксорубіцину. Незважаючи на зміщення у бік менших V_e (табл. 3.2), що на перший погляд вказує на збільшення розміру молекули і, відповідно, утворення комплексу, спектрофотометричний аналіз не виявив наявності доксорубіцину у відповідних фракціях, що вказує на відсутність утворення стабільного комплексу. Весь доксорубіцин елюється окремо у вигляді інтенсивного піка, що також підтверджується після спектрофотометричного вимірювання.

Порівняння об'ємів елюції, форм піків та спектрофотометричних вимірювань показує, що зв'язування супроводжується зміщенням піка у бік менших V_e та зміною його форми, що відповідає даним, що описані в

літературі, щодо взаємодії альбуміну з доксорубіцином. Ефективне утворення комплексу спостерігається лише для ковалентного зразка, а для нековалентної взаємодії характерне незалежне елюювання компонентів і відсутність стабільного комплексоутворення.

3.4. Динаміка вивільнення доксорубіцину

Даний експеримент було проведено з метою оцінки характеру та ступеня вивільнення доксорубіцину з комплексів сироваткового альбуміну.

На рис. 3.6 наведено результати досліджень вивільнення препарату для нековалентних та ковалентних комплексів та різних молярних співвідношень їх компонентів.

За даними проведеного експерименту встановлено суттєву різницю у профілях вивільнення для нековалентних та ковалентних комплексів. Для нековалентно зв'язаного доксорубіцину із сироватковим альбуміном спостерігається доволі швидке вивільнення, що досягає $80,40 \pm 3,92 \%$ протягом 24 годин за співвідношення 1:3, що зумовлено слабкими міжмолекулярними взаємодіями та наявністю вільного препарату в системі. Тоді як ковалентні комплекси демонструють значно повільніший характер вивільнення: максимальний ступінь вивільнення становить $34,98 \pm 0,91 \%$ за аналогічний період часу, що свідчить про високу стабільність зв'язування та контрольований характер вивільнення препарату.

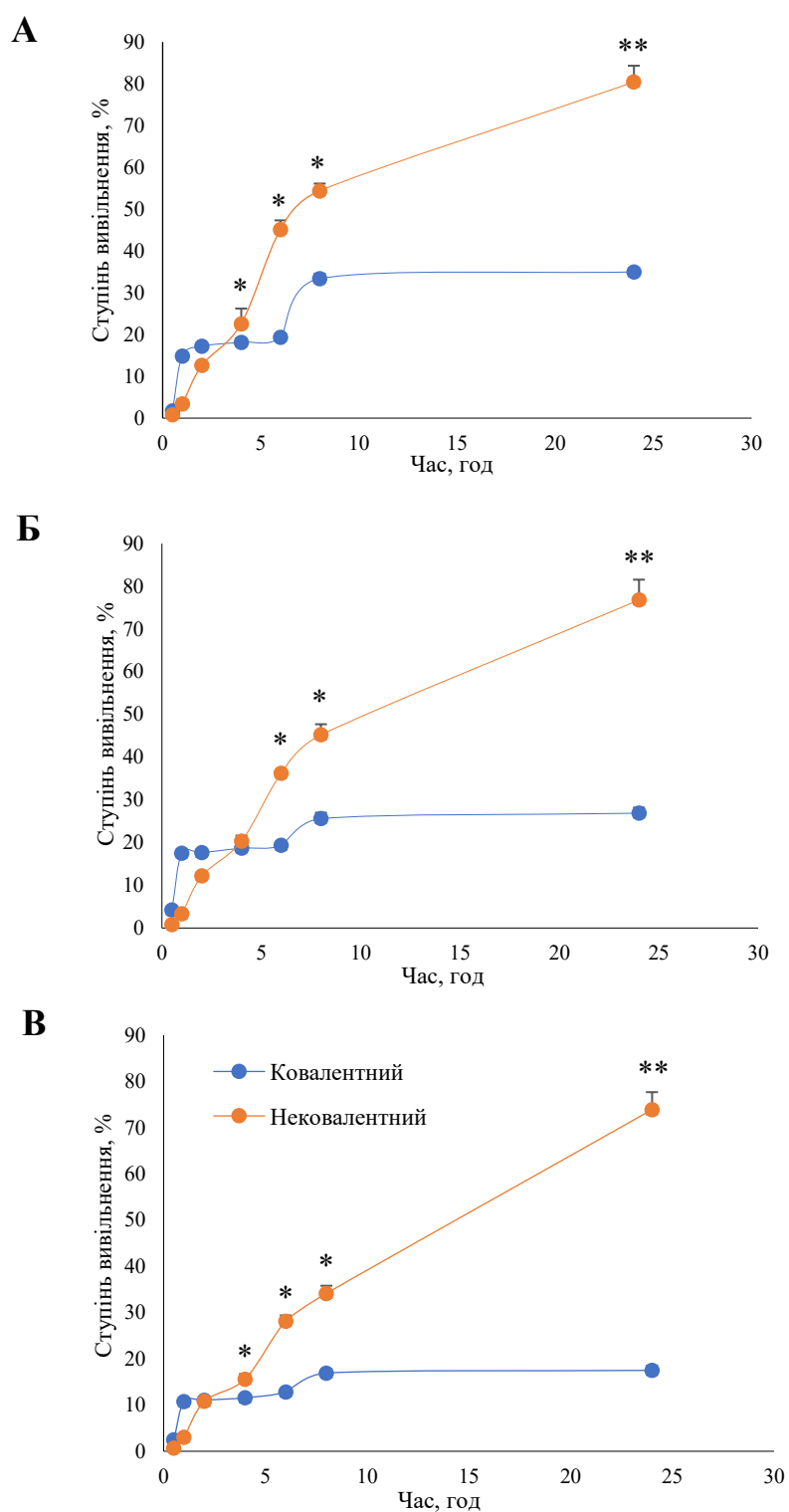


Рис. 3.6 Кінетика вивільнення доксорубіцину з нековалентного та ковалентного комплексів у фосфатному буфері, рН 7.4 ($M \pm m$; $n = 3$): А – при співвідношенні 1:3, Б – при співвідношенні 1:4, В – при співвідношенні 1:6
* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ - порівняно з ковалентним комплексом

Встановлено також залежність ступеня вивільнення від молярного співвідношення компонентів: зі збільшенням частки препарату зменшується кількість його вивільнення, що у випадку нековалентних взаємодій може бути обумовлено тільки співвідношенням кількості препарату та носія, а ковалентних – зменшенням частки вільного доксорубіцину та зниженням градієнта концентрації, а також більш ефективною адсорбцією препарату на поверхні носія.

Виявлені відмінності в кінетиці вивільнення доксорубіцину узгоджуються з літературними даними щодо систем контрольованого вивільнення лікарських сполук, зокрема доксорубіцину, де ковалентне зв'язування забезпечує пролонговане надходження препарату в середовище для зниження пікової токсичності.

3.5. Біологічна активність доксорубіцину, асоційованого з альбуміном

З метою оцінки біологічної активності утворених комплексів було проведено низку *in vitro* експериментів, спрямованих на вивчення їх цитотоксичної дії та ефекту на клітинних лініях.

Комплекси нековалентної та ковалентної природи в концентраціях 0,03 – 0,001 мкМ із трикратними серійними розведеннями були протестовані проти клітинної лінії U-373, що вважається моделлю агресивного раку мозку – гліобластоми людини. Результати були порівняні з тими, що отримані за допомогою вільного препарату доксорубіцину й утворених комплексів між собою.

На рис. 3.7 наведено дозозалежні криві виживаності клітин для досліджуваної системи.

Результати свідчать про високу протипухлинну активність ковалентного комплексу на клітинній лінії U-373 ($IC_{50} = 0,003$ мкМ), яка є приблизно втричі більшою, порівняно з вільним доксорубіцином ($IC_{50} = 0,01$ мкМ).

Нековалентний комплекс показав аналогічний до вільного доксорубіцину ефект ($IC_{50} = 0,01$ мкМ), тоді як альбумін практично не вплинув на життєздатність клітин (рис. 3.7).

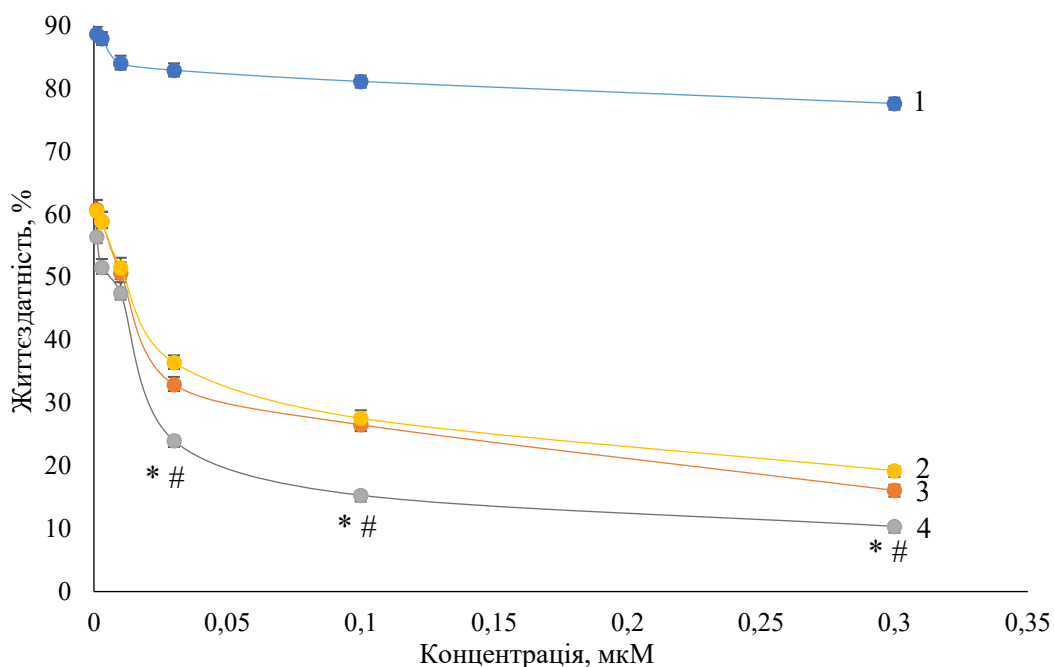


Рис. 3.7. Життєздатність клітин U-373, оцінена за допомогою МТТ-тесту:

1 – альбумін, 2 – доксорубіцин, 3 – нековалентний комплекс, 4 – ковалентний комплекс ($M \pm m$; $n = 3$)

* – $p < 0,05$, порівняно з доксорубіцином

– $p < 0,05$, порівняно з нековалентним комплексом

Отримані результати показують, що утворений ковалентний комплекс здатний з високою ефективністю вбивати ракові клітини. Це говорить про підвищення його протипухлинної дії за рахунок таргетної доставки, порівняно з вільним препаратом та нековалентно зв'язаним комплексом.

З метою кількісної оцінки інтенсивності накопичення доксорубіцину в пухлинних клітинах U-373 було використано метод проточної цитометрії, заснований на реєстрації флуоресценції самого препарату. Дослідження проводили для вільного альбуміну та доксорубіцину, а також ковалентного й нековалентного комплексів.

На рис. 3.8 наведена дозозалежна гістограма накопичення доксорубіцину у клітинах U-373.

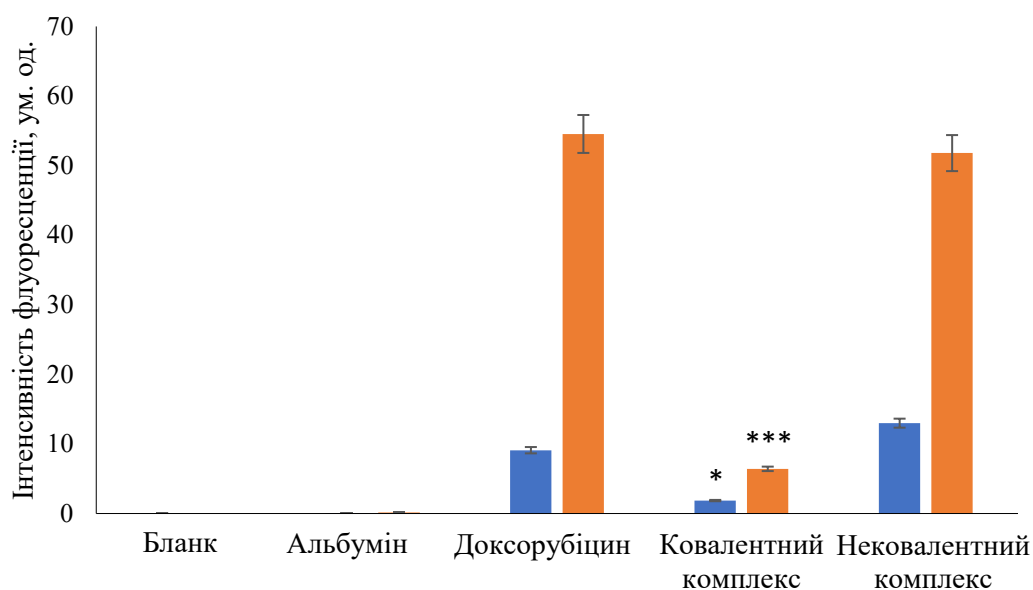


Рис. 3.8. Розподіл клітин за рівнем внутрішньоклітинної флуоресценції доксорубіцину (DOX⁺ клітин) ($M \pm m$; $n = 3$)

* – $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ - порівняно з доксорубіцином

Отримані результати показують, що у контрольних зразках – зразок з клітинами та з альбуміном - рівень флуоресценції DOX⁺ клітин мінімальний, що підтверджує відсутність накопичення доксорубіцину в клітинах за цих умов (див. Додаток Б 1). Для вільного доксорубіцину значення інтенсивності становлять $9,10 \pm 2,53$ та $54,55 \pm 12,38$ ум.од. (див. Додаток Б 2) при концентраціях 5 та 10 мкМ відповідно, що вказує на виражене дозозалежне накопичення препарату в клітинах U-373.

Нековалентний комплекс доксорубіцину з сироватковим альбуміном продемонстрував подібний характер. Інтенсивність його флуоресценції становить $12,99 \pm 3,77$ та $51,80 \pm 4,66$ ум.од. (див. Додаток Б 3) при концентраціях 5 та 10 мкМ відповідно. При концентрації 5 мкМ рівень флуоресценції нековалентного комплексу був дещо вищим за показники вільного доксорубіцину, тоді як при 10 мкМ значення залишалися близькими

до показників вільного препарату. Це може свідчити про часткову втрату стабільності комплексу у культуральному середовищі та вивільнення доксорубіцину.

Для ковалентного комплексу значення інтенсивності флуоресценції дещо нижчі. Вони становлять $1,86 \pm 0,66$ та $6,42 \pm 1,29$ ум. од. (див. Додаток Б 3) при тих же концентраціях. Незважаючи на наявність дозозалежності, загальний рівень накопичення залишається низьким, що свідчить про високу стабільність ковалентного зв'язку та обмежене вивільнення препарату у позаклітинному середовищі.

Варто зазначити, що отримані результати проточної цитометрії добре узгоджуються з даними щодо аналізу життєздатності, проте водночас виявляють певну особливість досліджуваної системи. Зокрема, ковалентний комплекс, незважаючи на значно нижчий рівень внутрішньоклітинного накопичення, демонструє найвищу протипухлинну активність. Такий ефект може бути пов'язаний із більш ефективною доставкою препарату в клітини за участю сироваткового альбуміну та його подальшим вивільненням у внутрішньоклітинних компартментах, що забезпечує більш селективну дію доксорубіцину.

ВИСНОВКИ

У результаті роботи було одержано нековалентні та ковалентні комплекси доксорубіцину з сироватковим альбуміном, досліджено особливості їх взаємодії, а також оцінено вплив типу комплексоутворення на фізико-хімічні та біологічні властивості отриманих систем. Результати показали, що ковалентна взаємодія забезпечує більш стабільні комплекси із контрольованим вивільненням, підвищеною протипухлинною ефективністю та селективністю дії.

1. За допомогою УФ-спектрофотометрії виявлено гіперхромний ефект у системах альбумін–доксорубіцин. Для ковалентних систем спостерігались більш виражені зміни спектрів, що вказує на структурні зміни білка.

2. Флуориметричним методом досліджено гасіння флуоресценції альбуміну при додаванні доксорубіцину. Розраховані значення констант зв'язування для нековалентного та ковалентного комплексів ($K_b = (6,60 \pm 0,49) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $K_b = (9,60 \pm 0,85) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ відповідно) свідчать про значно ефективнішу та стабільнішу взаємодію у випадку ковалентного комплексу.

3. За допомогою гель-фільтраційної хроматографії підтверджено утворення ковалентного комплексу, що супроводжується зміщенням об'єму елюції та наявністю зв'язаного доксорубіцину у фракціях. Для нековалентної системи стабільного комплексоутворення не зафіксовано.

4. Кінетика вивільнення, досліджена методом діалізу, показала швидке вивільнення для нековалентних комплексів (до $80,40 \pm 3,92 \%$ за 24 год) і пролонговане – для ковалентних (до $34,98 \pm 0,91 \%$), що підтверджує визначальний вплив типу взаємодії на біологічну активність систем: нековалентні комплекси швидко вивільняють препарат і діють подібно до вільного доксорубіцину, тоді як ковалентні забезпечують пролонговану дію та вищу протипухлинну ефективність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tacara, O., Sriamornsakb, P. and Dassa, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), pp. 157–170.
2. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering*, 11(6), pp. 1101–1110.
3. Tantari, M., Barra, F., Di Domenico, S., Ferraioli, D., Vellone, V.G., De Cian, F., Ferrero, S. (2019). Current state of the art and emerging pharmacotherapy for uterine leiomyosarcomas. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(6), pp. 713– 723.
4. Sritharan, S. and Sivalingam, N. (2021). A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sciences*, 278, 119527.
5. Bhadran, A., Polara, H., Babanyinah, G. K., Baburaj, S. and Stefan, M. C. (2025). Advances in doxorubicin chemotherapy: emerging polymeric nanocarriers for drug loading and delivery. *Cancers*, 17(14), 2303.
6. Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(4), pp. 853–858.
7. Zhao, N., Woodle, M.C. and Mixson, A. J. (2018). Advances in delivery systems for doxorubicin. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 9(5), pp. 1–9.
8. Luu, A. Z., Chowdhury, B., Al-Omran, M., Teoh, H., Hess, D. A. and Verma, S. (2018). Role of endothelium in doxorubicin–induced cardiomyopathy. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(6), pp. 861–870.
9. Yu, A. F., Chan, A.T and Steingart R.M. (2019). Cardiac Magnetic Resonance and Cardio–Oncology: Does T₂ Signal the End of Anthracycline Cardiotoxicity? *Journal of the American College of Cardiology*, 73(7), pp.792– 794.

10. Johnson-Arbor, K. and Dubey, R (2023). Doxorubicin: *StatPearls, Treasure Island (FL)* [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459232> [Accessed: 8 Aug. 2023].
11. Oikonomou, E., Anastasiou, M., Siasos, G., Androulakis, E., Psyrris, A., Toutouzas, K. and Tousoulis, D. (2018). Cancer Therapeutics–Related Cardiovascular Complications. Mechanisms, Diagnosis and Treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 24(37), 4424-4435.
12. Bukowski, K., Kciuk, M. and Kontek, R. (2020). Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3233.
13. Rawat, P. S., Jaiswal, A., Khurana, A., Bhatti, J. S. and Navik, U. (2021). Doxorubicin–induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139, 111708.
14. Lee, J., Choi, M.-K. and Song I.-S. (2023). Recent advances in doxorubicin formulation to enhance pharmacokinetics and tumor targeting. *Pharmaceuticals*, 16(6), p. 802.
15. Ahmad, N., Ahmad, R., Alam, M. A. and Ahmad, F. J. (2018). Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles. *Chemistry Central Journal*, 12(1), p. 65.
16. Oerlemans, C., Bult, W., Bos, M., Storm, G., Nijssen, J. F. W. and Hennink, W. E. (2010). Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical research*, 27(12), 2569-2589.
17. Murphy, G., Brayden, D. J., Cheung, D. L., Liew, A., Fitzgerald, M. and Pandit, A. (2025). Albumin–based delivery systems: Recent advances, challenges, and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 380, pp. 375–395.
18. Alghrably, M., Bennici, G. and Almohaywi, M. (2025). Albumin as a drug delivery system: mechanisms, applications. In: *Nanoparticle Drug Delivery – A Comprehensive Overview*. IntechOpen: London, UK, 23, pp. 345–372.

19. Lamichhane, S. And Lee, S. (2020). Albumin nanoscience: homing nanotechnology enabling targeted drug delivery and therapy. *Archives of Pharmacol Research*, 43(1), pp. 118–133.
20. Liu, Y., Li, Y., Shen, W., Li, M., Wang, W. and Jin, X. (2024). Trend of albumin nanoparticles in oncology: a bibliometric analysis of research progress and prospects. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1409163.
21. Ji, H., Zheng, Z., Li, S., Xiao, X., Tang, W., Zhang, X., Guo, G., He, Q., Cai, S., Jiang, P., Wang, H., Li, L., Xiao, X. and Wang, L. (2024). Research progress of serum albumin in the field of drug delivery. *Interdisciplinary Medicine*, 2(3), e20240010.
22. Al-Ani, A. and Alsahlanee, R. (2024). Designing of human serum albumin nanoparticles for drug delivery: a potential use of anticancer treatment. *Karbala International Journal of Modern Science*, 10(2), pp. 308–317.
23. Agudelo, D., Bourassa, P., Bruneau, J., Berube, G., Asselin, É. and Tajmir-Riahi, H. A. (2012). Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N- (trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins. *PLoS ONE*, 7(8), pp. 1–13.
24. Agudelo, D., Bérubé, G. and Tajmir-Riahi, H. A. (2016). An overview on the delivery of antitumor drug doxorubicin by carrier proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, pp. 354–360.
25. Jagusiak, A., Chłopaś, K., Zemanek, G., Kościk, I., Skorek, P. And Stopa, B. (2022). Albumin Binds Doxorubicin via Self-Assembling Dyes as Specific Polymolecular Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5033.
26. Demant, E. J. and Sehested, M. (1993). Recognition of anthracycline binding domains in bovine serum albumin and design of a free fatty acid sensor protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1156(2), pp.151–160.

27. Liu, Y., Corrales-Guerrero, S., Kuo, J. C., Robb, R., Nagy, G., Cui, T. and Williams, T. M. (2023). Improved targeting and safety of doxorubicin through a novel albumin binding prodrug approach. *ACS Omega*, 9(1), pp. 977–987.
28. Śliwińska-Hill, U., Krzyżak, E. and Czyżnikowska, Ż. (2024). The effect of simultaneous binding of doxorubicin and cyclophosphamide on the human serum albumin structure. *Journal of Molecular Liquids*, 404, 125003.
29. Ronzetti, M., Baljinnyam, B., Yasgar, A. and Simeonov, A. (2018). Testing for drug-human serum albumin binding using fluorescent probes and other methods. *Expert opinion on drug discovery*, 13(11), 1005-1014.
30. Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), pp.171–183.
31. Punith, R. and Seetharamappa, J. (2012). Spectral characterization of the binding and conformational changes of serum albumins upon interaction with an anticancer drug, anastrozole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 92, pp. 37–41.
32. Nasehi Najafabadi, P., Abnosi, M. H. and Sargolzaei, J. (2025). Molecular Insights into Doxorubicin–Human Serum Albumin Interactions: Binding Sites, Conformational Changes, and Pharmacokinetic Implications. *ChemistrySelect*, 10(39), pp. 102–110.
33. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), pp. 185–229.
34. Al-Harthi, S., Alshehri, A., Alhudhali, L., Alghrably, M., Bennici, G., Almohaywi, M. and Jaremko, M. (2025). Albumin as a Drug Delivery System: Mechanisms, Applications, and Innovations. In: IntechOpen, ed. 2025. *Albumin as a Drug Delivery System*. London, pp. 136– 151.
35. Elsadek, B. and Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery – New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157(1), pp. 4–28.

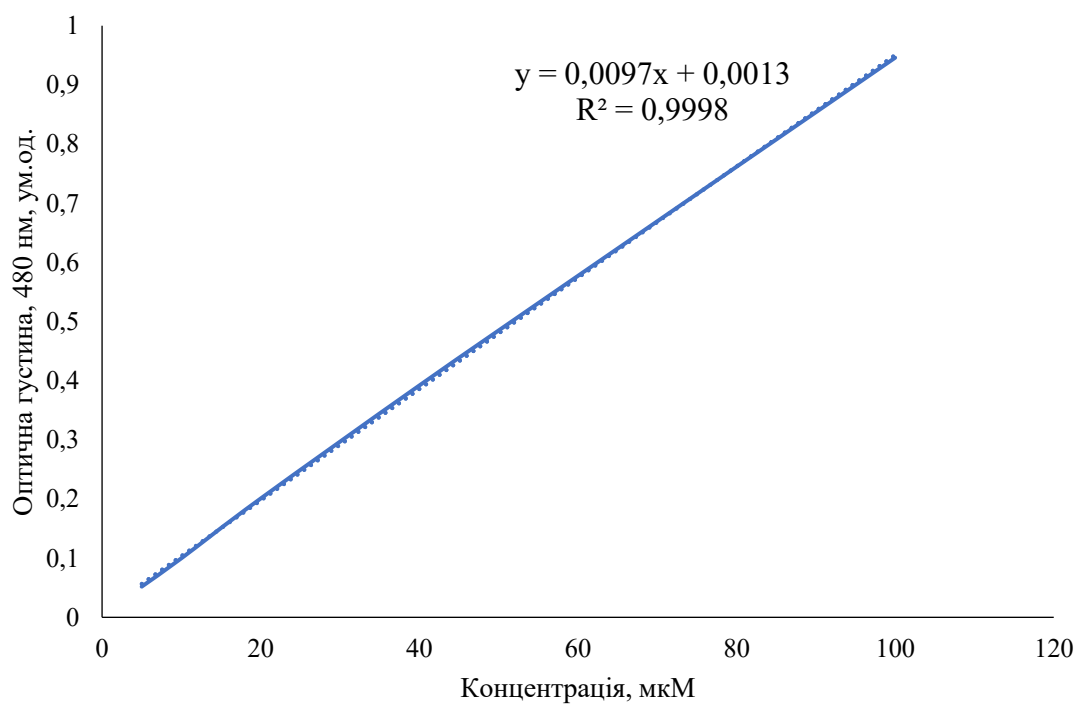
36. Hassanin, I. and Elzoghby, A. (2020). Albumin-based nanoparticles: a promising strategy to overcome cancer drug resistance. *Cancer Drug Resistance*, 3(4), pp. 930.
37. Guo, R., Zhong, L., Ma, S., Gong, B., Shen, C., Wang, Z. and Gong, T. (2024). A biomimetic solution, albumin–doxorubicin molecular complex, targeting tumor and tumor-draining lymph nodes. *Journal of Materials Chemistry B*, 12(47), pp. 12320–12337.
38. Bartlett, B., Klier, J. and Razavi, S. (2025). Preparation of bovine serum albumin nanospheres via desolvation: a study of synthesis, characterization, and aging. *Nanoscale*, 17(10), 5715–5731.
39. Asariha, M., Kiaie, S., Izadi, S., Pirhayati, F., Fouladi, M. and Gholamhosseinpour, M. (2022). Extended-release of doxorubicin through green surface modification of gold nanoparticles: in vitro and in ovo assessment. *BMC chemistry*, 16(1), pp. 110.
40. Chaiwaree, S., Prapan, A., Suwannasom, N., Laporte, T., Neumann, T., Prub, A. and Baumler, H. (2020). Doxorubicin–loaded human serum albumin submicron particles: preparation, characterization and in vitro cellular uptake. *Pharmaceutics*, 12(3), pp. 224.
41. Wang, Y., Li, J., Li, X., Gao, B., Chen, J. and Song, Y. (2025). Spectroscopic and molecular docking studies on binding interactions of camptothecin drugs with bovine serum albumin. *Scientific Reports*, 15(1), 8055.
42. Sargolzaei, J., Jalali, E. and Rajabi, P. (2024). Insights into the binding of buspirone to human serum albumin using multi–spectroscopic and molecular docking techniques. *Heliyon*, 10(8).
43. Kalenichenko, D., Kriukova, I., Karaulov, A., Nabiev, I. and Sukhanova, A. (2024). Cytotoxic effects of doxorubicin on cancer cells and macrophages depend differently on the microcarrier structure. *Pharmaceutics*, 16(6), pp. 785.

44. Kauffman, M. K., Kauffman, M. E., Zhu, H., Jia, Z. and Li, Y. R. (2016). Fluorescence-based assays for measuring doxorubicin in biological systems. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 2(6), pp. 432 – 439.
45. Zhou, Y., Sridhar, R., Shan, L., Sha, W., Gu, X. and Sukumar, S. (2012). Loperamide, an FDA-approved antidiarrhea drug, effectively reverses the resistance of multidrug resistant MCF-7/MDR1 human breast cancer cells to doxorubicin-induced cytotoxicity. *Cancer investigation*, 30(2), pp. 119–125.

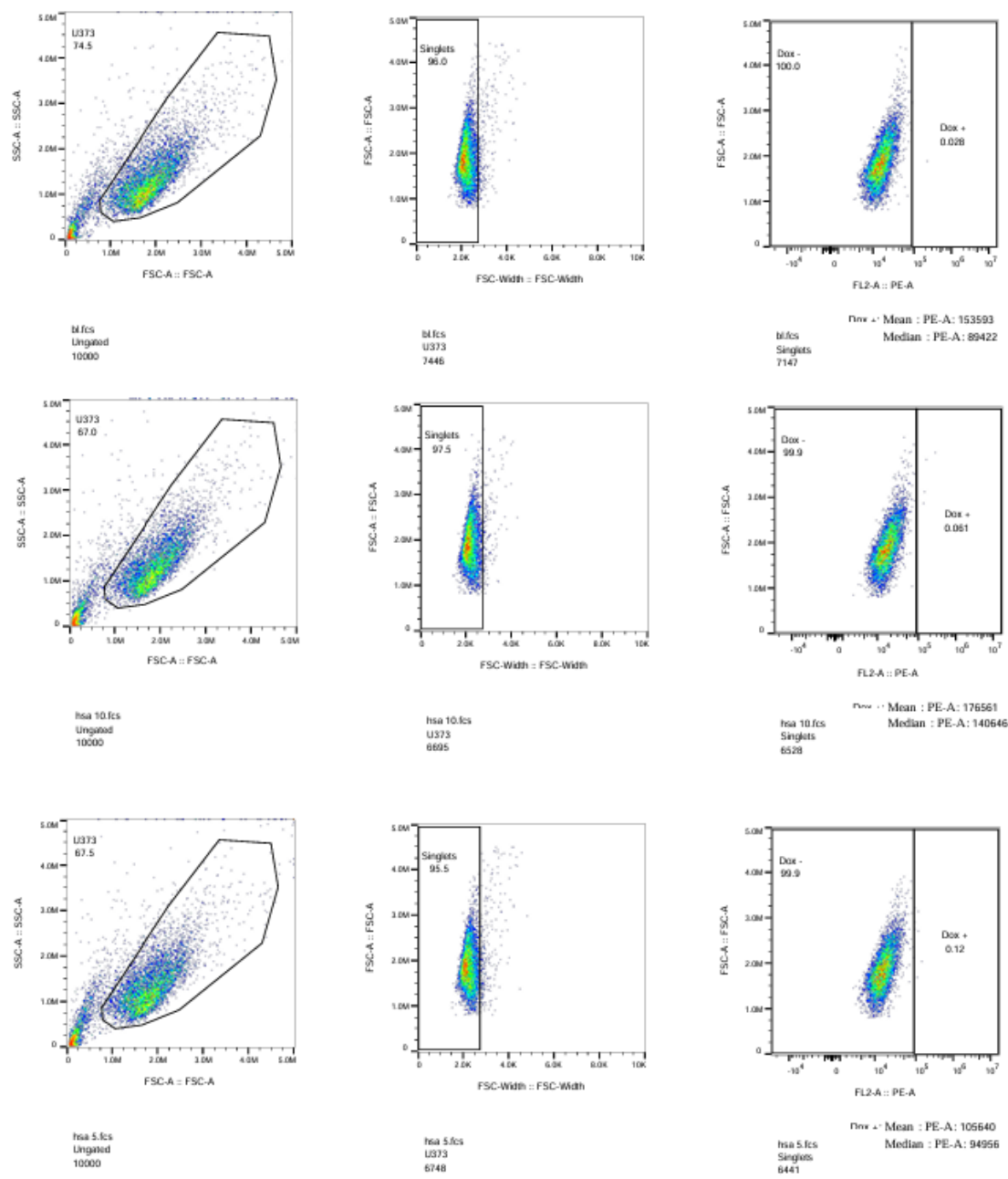
ДОДАТКИ

Додаток А

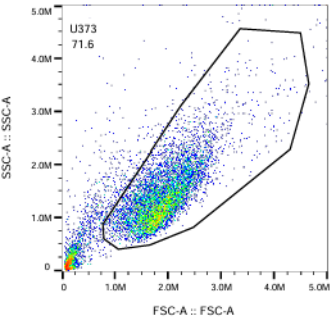
**Калібрувальна залежність оптичної густини від концентрації
доксорубіцину, отримана методом спектрофотометрії**



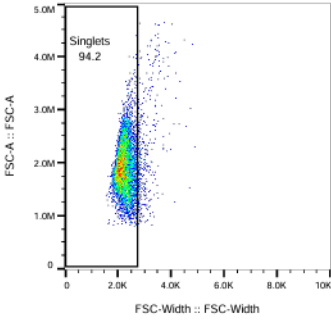
Рівень флуоресценції клітин (DOX+), визначений методом проточної цитометрії, для бланкового та альбумінового зразків (2,5, 5 мкМ)



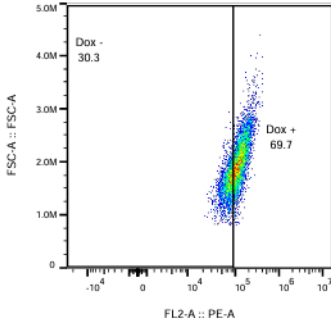
Рівень флуоресценції клітин (DOX+), визначений методом проточної цитометрії, для зразків вільного доксорубіцину (5, 10 мкМ)



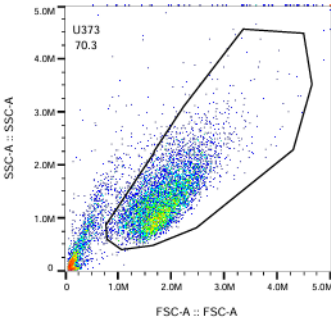
dox 10.fcs
Ungated
10000



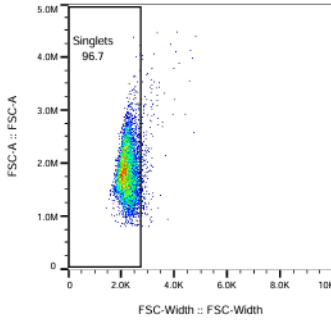
dox 10.fcs
U373
7159



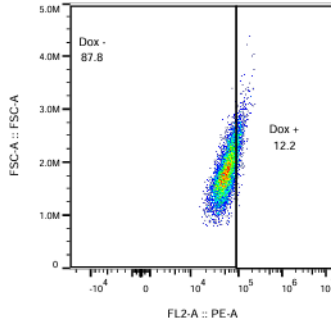
dox 10.fcs
Singlets
6745
Div 1: Mean : PE-A: 135520
Median : PE-A: 125421



dox 5.fcs
Ungated
10000



dox 5.fcs
U373
7027



dox 5.fcs
Singlets
6792
Div 1: Mean : PE-A: 104932
Median : PE-A: 98840

Рівень флуоресценції клітин (DOX+), визначений методом проточної цитометрії, для зразків ковалентного та нековалентного комплексів (5, 10 мкМ)

