



УДК 615.31

© 2011

Н. О. Горчакова, член-кореспондент НАН України **І. С. Чекман**,
Н. М. Власова, **Л. П. Головкова**, **І. І. Геращенко**, **О. О. Максимчук**

Комплексоутворення доксорубіцину з бичачим сироватковим альбуміном

Висвітлено взаємодію доксорубіцину з сироватковим альбуміном, встановлену методом спектрофотометрії. Розраховано логарифм стійкості комплексу доксорубіцину з сироватковим альбуміном. Встановлено, що доксорубіцин утворює міцний комплекс з сироватковим альбуміном складу 2 : 1.

Доксорубіцин є одним з головних лікарських засобів в схемах лікування онкологічних та гематологічних захворювань [1–4]. Основні ускладнення при його застосуванні пов'язані з кардіотоксичністю, що може привести до розвитку тяжкої серцевої недостатності, фатальним порушенням ритму серця і провідності міокарду. Розвиток ускладнень фармакотерапії доксорубіцином розвивається внаслідок змін синтезу нуклеїнових кислот, цитоплазматичної мембрани, ендотелію судин, енергетичного обміну та активацією перекисного окиснення ліпідів [5]. В комплексу фармакотерапію доксорубіцином вважали доцільним включення біологічно активних сполук, що мають антиоксидантні та комплексоутворюючі властивості для пониження токсичності антрациклінового антибіотика [6, 7]. Альбумін плазми — головний білок крові, що контактує з усіма клітинами організму і завдяки амінокислотам, що входять до його складу, має антиоксидантні властивості [8]. Крім того, до 70% циркулюючих молекул альбуміну мають вільну сульфгідрильну групу, яка бере участь в дисульфідному обміні, утворює комплекси з різними акценторами та має дезінтоксикаційну дію [9].

Метою даної роботи було визначення взаємодії доксорубіцину з сироватковим альбуміном та складу утвореного комплексу.

Експериментальна частина. В роботі використана лікарська форма доксорубіцину у вигляді ліофілізованого порошку для ін'єкцій, що містить 20% діючої речовини (ТОВ “ЛЕНС-ФАРМ”, дочірня компанія ЗАТ “Верофарм”, Москва), та бичачий сироватковий альбумін (вміст $\geq 98\%$, М. м. 67 000, FLUKA, Швейцарія).

Дослідження взаємодії доксорубіцину з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) проводили, додаючи до розчину доксорубіцину ($C_{\text{докс}} = 1,77 \cdot 10^{-4}$ моль/л) у воді наважки БСА таким чином, щоб відношення концентрацій БСА до доксорубіцину змінювались від 0

до 1, та реєстрували спектр поглинання доксорубіцину у видимій області спектра. Спектрофотометричні дослідження проводили на приладі "SPECORD M-40", Німеччина, Carl Zeiss.

Для визначення складу комплексу, що утворився, використовували метод ізомолярних серій (метод Остромисленського–Жоба) [10]. Для цього проводили вимірювання оптичної густини поглинання доксорубіцину в серії розчинів з постійною сумарною молярною концентрацією даного препарату та альбуміну ($C_{\text{докс}} + C_{\text{БСА}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л = const), але з їх різним співвідношенням.

В обох серіях дослідів величина рН розчинів коливалась від 6,8 до 7,1. В цих межах рН спектр доксорубіцину залишається незмінним [10].

Результати та їх обговорення. Додавання БСА до розчину доксорубіцину приводить до зсуву максимуму смуги його поглинання від 482,6 до 484,7 нм, при цьому оптична густина поступово зменшується (табл. 1). Це можна пояснити тим, що в розчині відбувається процес комплексоутворення між доксорубіцином та альбуміном. В усіх подальших розрахунках використовували оптичну густина розчину доксорубіцину (A) при постійній довжині хвилі $\lambda = 483$ нм (молярний показник поглинання $\varepsilon_0 = 9932$).

Залежність оптичної густини розчину доксорубіцину (A) від співвідношення концентрацій БСА та доксорубіцину наведена на рис. 1, звідки видно, що на кривій залежності спостерігається плато при $C_{\text{БСА}}/C_{\text{докс}} > 0,5$, тобто крива виходить на насичення, коли концентрація білка в розчині вдвічі менша за концентрацію доксорубіцину. Це може свідчити як про утворення комплексів більш високого складу, ніж 1 : 1, так і про досить міцне зв'язування доксорубіцину з БСА.

Згідно з методом ізомолярних серій була побудована залежність зміни оптичної густини розчинів доксорубіцину $\Delta A = (A_0 - A)$ (де A_0 та A — поглинання доксорубіцину без альбуміну та в присутності альбуміну, відповідно) від складу розчину $C_{\text{докс}}/(C_{\text{докс}} + C_{\text{БСА}})$, як видно на рис. 2. Наведена крива залежності вмісту комплексу від його складу має максимум при $C_{\text{докс}}/(C_{\text{докс}} + C_{\text{БСА}}) = 0,66$, що відповідає стехіометричним коефіцієнтам у рівнянні утворення комплексу 2 : 1, тобто дві молекули доксорубіцину на одну молекулу альбуміну. Виходячи з цього, рівняння утворення та константа стійкості (K) комплексу доксорубіцину з альбуміном виражаються так:



де D та B — доксорубіцин та БСА, відповідно,

$$K = \frac{[D_2B]}{[D]^2[B]} = \frac{[D_2B]}{(D_0 - 2[D_2B])^2(B_0 - [D_2B])}.$$

Таблиця 1. Залежність оптичної густини розчину доксорубіцину (A) від концентрації альбуміну $C_{\text{БСА}}$ та від співвідношення концентрацій БСА й доксорубіцину $C_{\text{БСА}}/C_{\text{докс}}$ при довжині хвилі $\lambda = 483$ нм

$C_{\text{БСА}}$, моль/л	$C_{\text{БСА}}/C_{\text{докс}}$	A , $\lambda = 483$ нм
0	0	1,7550
$1,77 \cdot 10^{-5}$	0,1	1,6753
$3,54 \cdot 10^{-5}$	0,2	1,6278
$5,31 \cdot 10^{-5}$	0,3	1,5891
$7,08 \cdot 10^{-5}$	0,4	1,5739
$8,85 \cdot 10^{-5}$	0,5	1,5660
$1,239 \cdot 10^{-4}$	0,7	1,5621
$1,77 \cdot 10^{-4}$	1,0	1,5619

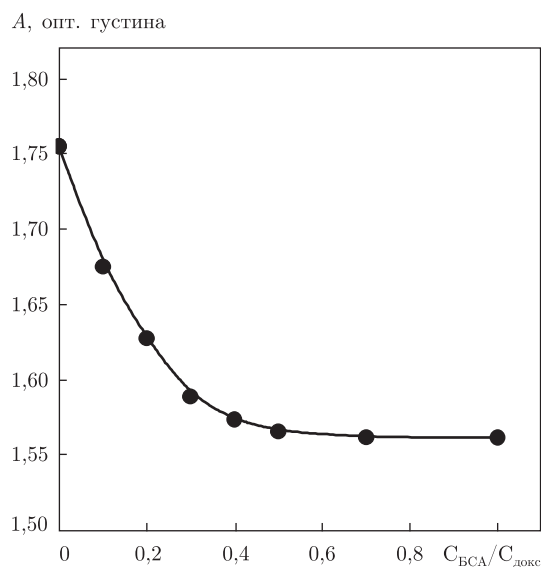


Рис. 1. Залежність оптичної густини розчину доксорубіцину (A) від відношень концентрацій $C_{BSA}/C_{докс}$ при довжині хвилі $\lambda = 483$ нм

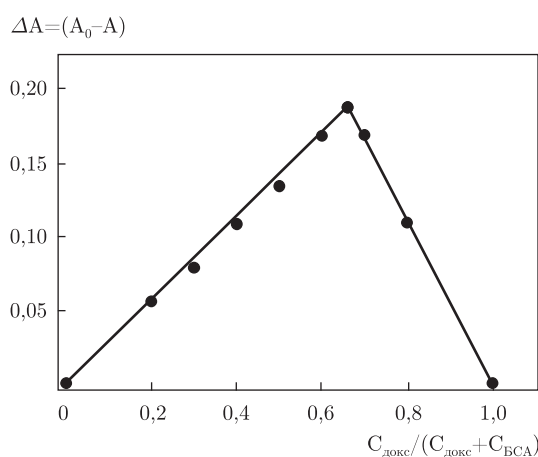


Рис. 2. Залежність зміни оптичної густини розчину доксорубіцину $\Delta A = (A_0 - A)$ від складу комплексу $C_{докс}/(C_{докс} + C_{BSA})$ (метод ізомолярних серій)

Тут D_0 — вихідна концентрація доксорубіцину ($D_0 = 1,77 \cdot 10^{-4}$ моль/л); $B_0 = C_{BSA}$ — загальні концентрації альбуміну згідно з точно взятою наважкою (наведені в табл. 1), а величини $[D_2B]$, $[B]$, $[D]$ відповідають рівноважним молярним концентраціям комплексу та його компонентів.

Використовуючи балансові рівняння з концентрацій доксорубіцину

$$D_0 = [D] + 2[D_2B]$$

та БСА

$$B_0 = [B] + [D_2B],$$

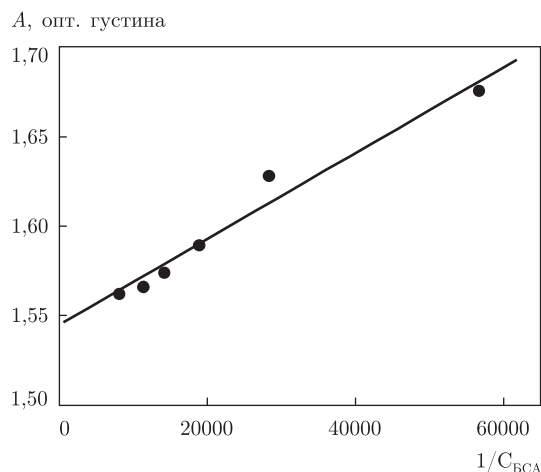


Рис. 3. Визначення молярного показника поглинання комплексу (ε_K) доксорубіцину з БСА

а також рівняння для оптичної густини розчину доксорубіцину з альбуміном

$$A = \varepsilon_0[A] + \varepsilon_K[D_2B]$$

та розв'язуючи систему цих рівнянь, можна розрахувати константу стійкості комплексу, що утворився.

У наведених рівняннях величини D_0 , B_0 та ε_0 відомі, невідомим залишається ε_K — молярний показник поглинання комплексу. Для визначення цього показника була побудована залежність оптичної густини розчину доксорубіцину (A) від оберненої концентрації альбуміну (рис. 3) [11]. Екстраполяція одержаної прямої на нескінченно велику концентрацію БСА (тобто, коли $1/C_{BCA} = 0$) дає величину оптичної густини поглинання комплексу $A_K = 1,54$ і, відповідно, $\varepsilon_K = A_K/C_{\text{докс}} = 8720$.

Розрахований за вищенаведеними рівняннями логарифм константи стійкості комплексу доксорубіцину з БСА становить $\lg K = 6,7$.

Таким чином, проведені дослідження та розрахунки свідчать про те, що доксорубіцин утворює міцний комплекс з бичачим сироватковим альбуміном складу 2 : 1.

Завдяки утворенню комплексу доксорубіцину з альбуміном можливе здійснення метаболічної перебудови молекули доксорубіцину і пониження його токсичності. Це спостерігається у випадках, коли не порушена транспортна система альбуміну плазми крові і може здійснюватися природна дезактивація токсичної сполуки. Антитоксичний ефект альбуміну може також здійснюватися внаслідок його впливу на механізми біотрансформації доксорубіцину, підвищення сорбційної ємності еритроцитів, поліпшенню реологічних властивостей крові та розвитку благодійних змін з боку системи перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту організму.

1. *Крячок И. А., Мартынич А. В., Титаренко И. Б. и др.* Современные алгоритмы лечения больных лимфомой Ходжкина на поздних стадиях // Укр. мед. часопис. – 2009. – **73**, № 5. – С. 76–79.
2. *Крячок И. А.* Сучасні стандарти діагностики та лікування хворих на множинну мієлому // Там само. – 2010. – **76**, № 2. – С. 91–97.
3. *Jimenez V. J.* Vincristine, doxorubicin, and dexamethasone or thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed patients with multiple myeloma? // Eur. J. Haematol. – 2006. – **77**, No 3. – P. 239–244.
4. *Dann E. J., Barshalom R., Tamir A. et al.* Risk-adapted BEACOPP regimen can reduce the cumulative dose of chemotherapy for standard and high-risk Hodgkin lymphoma with no impairment of outcome // Blood. – 2007. – **109**, No 3. – P. 905–909.

5. Каменкина Н. В. Антрациклиновые кардиомиопатии // Укр. кардиол. журн. – 2004. – № 2. – С. 112–116.
6. Чекман І. С., Горчакова Н. О., Нагорна О. О., Небесна Т. Ю. Нікотинамід. – Київ: Поліграфплюс, 2008. – 111 с.
7. Mykhaluk O. M., Dudchenko N. O., Dudchenko A. K. Pharmacokinetics of the doxorubicin magnetic nanoconjugate in mice. Effects of the nonuniform stationary magnetic field // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 5. – С. 80–92.
8. Сичичкин А. А. Сывороточный альбумин как биоантиоксидант: Матер. междунар. симпозиума в рамках междунар. выставки “Медицина и охрана здоровья. Медтехника и аптека”, 16–19 сент., 1997. – Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1997. – 19 с.
9. Сидоренко Ю. С., Владимиров Л. Ю., Франциянц Е. М. Влияние химиопрепаратов на структуру и функциональные свойства альбумина сыворотки крови больных раком молочной железы // Вопр. онкологии. – 2001. – **47**, № 3. – С. 303–306.
10. Власова Н. Н., Давиденко Н. К., Бидзиля В. А. и др. Адсорбция противоопухолевого антибиотика адриамицина на высокодисперсном кремнеземе // Журн. физ. химии. – 1993. – **67**, № 10. – С. 2010. – 2013.
11. Яцимирский К. Б., Васильев В. П. Константы нестойкости комплексных соединений. – Москва: Изд-во АН СССР, 1959. – 206 с.

Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ
Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 06.07.2010

N. O. Gorchakova, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. S. Chekman**,
N. M. Vlasova, **L. P. Golovkova**, **I. I. Gerashenko**, **O. O. Maximchuk**

Doxorubicin complexation with bovine serum albumin

The interaction of doxorubicine with serum albumin is studied with the use of spectrophotometry. The logarithm of the stability of a complex of doxorubicin with serum albumin has been calculated. It is shown that doxorubicin with albumin form a stable complex of structure 2 : 1.