

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ГОНЧАРЕНКО НАДІЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК 538.958: 535.37: 535.34:
539.196: 539.194: 539.199.

**ГЕТЕРОАСОЦІАЦІЯ КОНІУМ-С₆₀ ТА
ДОКСОРУБІЦИН-АЛЬБУМІН-НАНОЧАСТИНКИ ЗОЛОТА**

Спеціальність 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Київ 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фізики функціональних матеріалів Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, доцент
Дмитренко Оксана Петрівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри фізики
функціональних матеріалів

Офіційні опоненти: доктор фізико-математичних наук, професор
Чалий Кирило Олександрович,
Національний медичний університет
ім. О.О. Богомольця МОН і МОЗ України,
професор кафедри
медичної і біологічної фізики та інформатики,

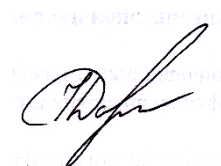
доктор фізико-математичних наук, професор
Горбик Петро Петрович,
Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України,
завідувач відділу наноматеріалів.

Захист відбудеться «06» квітня 2021 р. о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.08 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, пр. Академіка Глушкова 4, корп. 1, фізичний факультет, ауд. 200.

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58 або на сайті Науково-консультаційного центру Київського національного університету імені Тараса Шевченка за посиланням <http://scc.univ.kiev.ua/abstracts>.

Автореферат розісланий «___» березня 2021р.

В.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради Д.26.001.08,
доктор фізико-математичних наук



І.Ю.Дорошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогоднішній день онкологічні захворювання займають друге місце за рівнем смертності після серцево-судинних. Важливу роль у боротьбі з ними відведено удосконаленню протипухлинних агентів не лише внаслідок хімічної, а й фізичної оптимізації їх властивостей для зменшення токсичних уражень нормальних тканин, подолання резистентності, покращення таргетності та інших фармакологічних показників. Створення проліків, підвищення їх ефективності та локальна доставка, що ґрунтується на встановленні фундаментальних механізмів вдосконалення терапевтичних властивостей діючої речовини і її транспортування, є одними з найактуальніших завдань сучасної медицини.

Для вивчення можливості утворення міжмолекулярних асоціатів, кон'югатів молекул з наночастинками, механізмів взаємодії у вказаних системах необхідно встановити ряд важливих характеристик, таких як рівноважні константи в гетеросистемах, число можливих місць зв'язування між складовими молекулами, розміщення взаємодіючих молекул, їх конформаційні стани, природу сил та механізми зв'язування враховуючи вплив оточуючого середовища. З цією метою широко використовуються спектрофотометричні методи, включаючи спектроскопію оптичного поглинання, фотолюмінесценції, комбінаційного розсіяння світла (КРС), ІЧ-поглинання. Ці методи є особливо важливими при вивченні комплексоутворення молекул медичних препаратів з транспортними білками, наприклад, доксорубіцину, як протипухлинного препарату, з бичачим сироватковим альбуміном (БСА).

Ще більш необхідним є вивчення фізичної взаємодії молекул лікарського агента з названими протеїнами, та з наночастинками золота (AuНЧ). Такі відомості дозволяють контролювати вибірковість, швидкість та якість доставки лікарського агента до ураженої ділянки. Наночастинки, як фізичні складові проліків, викликають особливий інтерес, оскільки для них характерним є існування локального поверхневого плазмонного резонансу (ЛППР), спектроскопічні характеристики якого істотно залежать від розміру і форми наночастинок, а також демонструють прояви електронного обміну з атомами і молекулами. Однією з важливих задач при вивченні гетероасоціації макромолекул БСА з молекулами доксорубіцину в присутності AuНЧ є визначення їх впливу на параметри міжмолекулярного зв'язування і, як наслідок, встановлення механізмів міжмолекулярної взаємодії в гетероасоціатах.

Інший клас проліків ґрунтується на утворенні гетероасоціатів з вуглецевими наноструктурами, в першу чергу, з фулереном C_{60} . До таких проліків можна віднести комплекси коніум- C_{60} , в яких помітно проявляється перебудова конформаційних станів складових цього рослинного протипухлинного препарату, в тому числі γ -коніцеїну. Така перебудова імовірно призводить до зміни фармакологічних властивостей даного препарату.

Окрім цього, важливою частиною прогнозування фізико-хімічних та фармакологічних характеристик лікарських препаратів є квантово-хімічне моделювання їх молекулярної будови, електронної та коливної структур, конформаційних перетворень шляхом розрахунку спектральних характеристик.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною досліджень, які проводяться на кафедрі фізики функціональних матеріалів фізичного факультету Київського національного університету імені Тараса

Шевченка відповідно до Комплексної наукової програми «Конденсований стан - фізичні основи новітніх технологій». Проведені дослідження виконані в рамках держбюджетних тем "Радіаційно-стимульовані перетворення електронно-конформаційних станів нанорозмірних систем і нанокомпозитів" (№д/р 0116U007145), «Радіаційна модифікація фотопровідності в полімерних нанокомпозитах, наповнених барвниками і вуглецевими наноструктурами» (№д/р 0116U007373), «Встановлення механізмів підвищення контактної електропровідності в радіаційно функціоналізованих полімерних композитах із π -спряженими модифікаторами» (№д/р 0119U100186), «Механізми комплексоутворення та електронних збуджень у сполуках спряжених систем з наноструктурами» (№ДР 0119U100309).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є вивчення електронних, коливних та оптичних властивостей молекул лікарських агентів - мелоксикаму, алкалоїдів коніуму, доксорубіцину, а також встановлення фізичних механізмів гетероасоціації у водних розчинах коніуму з молекулами фулерену C_{60} та доксорубіцину з транспортним білком, бичачим сироватковим альбуміном і наночастинками золота.

Об'єкт дослідження: фізичні властивості та механізми гетероасоціації молекул лікарських препаратів з макромолекулами білків та металевими наноструктурами.

Предмет дослідження: електронні, коливні та оптичні властивості молекул медичних препаратів та механізми їх гетероасоціації з молекулами фулеренів C_{60} і транспортними білками бичачого сироваткового альбуміну в присутності наночастинок золота.

Методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані за допомогою методів ІЧ та спектроскопії комбінаційного розсіяння світла плівкових зразків, спектроскопії електронного оптичного поглинання, спектрофлуориметрії збудження і емісії водних розчинів молекул. Теоретичний аналіз експериментальних результатів було проведено на основі теорій гасіння флуоресценції Штерна-Вольмера, ефективного середовища Фьорстера та рівнянь Вант-Гоффа. Окрім цього, для досягнення мети було проведено квантово-хімічне та докінг-моделювання досліджуваних препаратів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше проведено квантово-хімічне моделювання будови, електронної структури, локалізації молекулярних орбіталей для медичного препарату мелоксикаму і встановлено, що молекула мелоксикаму може бути віднесена до м'яких за значенням абсолютної жорсткості ($\eta=4,12$ еВ) і тому характеризується високою фармакологічною активністю.

Вперше встановлено, що при комплексоутворенні рослинного протипухлинного препарату коніуму з молекулами фулерену C_{60} відбувається істотна перебудова конформаційних станів молекул його складових, алкалоїдів, зокрема γ -коніцеїну, що супроводжується зміною біологічної активності препарату.

Вперше показано, що у випадку взаємодії протипухлинного препарату доксорубіцину із AuНЧ сферичної форми з цитрованою поверхнею відбувається зміна протонованої форми молекул препарату від монокатіонної до двоаніонного типу.

Вперше показано, що додавання золотих наночастинок до розчину у воді БСА-ДР призводить до значної перебудови конформаційних станів альбуміну.

Вперше продемонстровано, що додавання до розчину у воді молекул доксорубіцину та наночастинок золота макромолекул протеїну БСА відбувається стабілізація наночастинок, яка супроводжується відновленням розчину, що зростає зі збільшенням

вмісту альбуміну. Вперше показано, що при додаванні до розчину у воді молекул доксорубіцину і протеїну наночастинок золота з малим вмістом міжмолекулярна гетероасоціація відбувається зі зменшенням константи стійкості K_C та збереженням числа місць зв'язування $n=2$.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати важливі для подальшого розвитку уявлень про фізичні процеси, обумовлені взаємодією молекул лікарських препаратів з білками та біологічними об'єктами в цілому. У медичній практиці отримані результати створюють перспективи для розробки нових лікарських препаратів, що будуть більш ефективними в боротьбі з онкологічними захворюваннями в порівнянні з вже відомими.

Особистий внесок здобувача. Усі наукові результати дисертації та висновки були отримані здобувачкою особисто. Постановку задачі було здійснено науковим керівником д.ф.-м.н., доцентом Дмитренко О.П. Дисертантка самостійно проаналізувала великий масив літературних даних та попередніх напрацювань науковців за обраною тематикою, необхідних для освоєння методики) приготування рідких і плівкових зразків, обробки даних та інтерпретації результатів. Здобувачка підготувала та провела експериментальне вимірювання спектрів ІЧ-поглинання, комбінаційного розсіяння світла, флуоресценції, електронного оптичного поглинання, а також квантово-хімічні розрахунки та докінг моделювання, висвітлені в роботах [1–8]. Аналіз та обговорення даних квантово-хімічного моделювання молекули препарату мелоксикаму, наведених в роботах [9,10], відбувалися за активної участі дисертантки. Матеріали та тези доповідей на наукових конференціях, що додатково відображають результати даної дисертаційної роботи [11-22], дисертантка особисто підготувала до публікації та представила у доповідях численних наукових конференцій.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на таких міжнародних та українських конференціях: Міжнародна наукова конференція «Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології (НАНСИС–2013) (Київ, Україна, 2013)», Наукова конференція молодих вчених «Наука ХХІ сторіччя» (Київ, Україна, 2013, 2015), Міжнародна конференція «Медична фізика - сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології» (Kyiv, Ukraine, 2014, 2015, 2017, 2018), Intern. conf. Nanobiophysics: Fundamental and Applied Aspects (Kyiv, Ukraine, 2015, Kharkiv, Ukraine, 2017), Всеукраїнська конференція «Хімія, фізика та технологія поверхні. Наноструктуровані біосумісні/біоактивні матеріали» (Київ, Україна, 2015), Науково-практична конференція YOUTHNANOBIOTECH-2016, молодіжний форум з нанобіотехнологій (Київ, Україна, 2016), International research and practice conference 'Nanotechnology and nanomaterials' (NANO-2018) (Kyiv, Ukraine, 2018).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи було опубліковано 9 статей у наукових фахових журналах [1-9], 1 монографія у співавторстві [10], а також додатково представлені у 12-ти тезах доповідей на міжнародних наукових конференціях [11-22].

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, п'яти розділів, висновків та списку використаних джерел. Робота містить 83 рисунки та 16 таблиць. Повний обсяг дисертації складає 150 сторінок машинного тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано вибір теми, визначено предмет, об'єкт, сформульовано основні завдання та мету дисертаційної роботи, висвітлено наукову новизну отриманих результатів та наведено дані, щодо їх апробації.

Актуальність роботи визначається постійною потребою у вдосконаленні хіміотерапевтичних препаратів з огляду на різноманітну чутливість різних злоякісних клітин до дії препаратів, а також численні побічні реакції організму, що виникають в процесі лікування за рахунок їх токсичності. Оскільки протипухлинна активність сильно обмежена цими факторами, отримані результати можуть бути використані при розробці модифікованих форм хіміопрепаратів з метою зменшення їх токсичної дії на здорові тканини та подолання резистентності злоякісних клітин.

У **розділі 1** представлено огляд літературних даних, що описують загальні характеристики нестероїдного протизапального препарату мелоксикаму, хіміотерапевтичних агентів коніуму та доксорубіцину, а також описано теоретичний та експериментальний досвід науковців, пов'язаний з даними агентами та біоструктурами. Зокрема, проілюстровано результати теоретичних розрахунків структури та енергетичних характеристик деяких лікарських засобів за допомогою методів, що використовувались під час виконання завдань даної дисертаційної роботи. Окрім цього, було розкрито відомості про молекулярну будову, фізичні властивості, різноманітність форм лікарських агентів, відомі на сьогоднішній день оптичні, конформаційні, електронні властивості молекул мелоксикаму, алкалоїдів коніуму, доксорубіцину а також методи виявлення та вивчення їх взаємодії з біоструктурами організму таметалевими наноструктурами.

У **розділі 2** висвітлені основні аспекти методики виконання дисертаційної роботи. Зокрема, в загальних рисах описано теоретичне підґрунтя виконаних квантово-хімічних обчислень, Квантово-хімічні розрахунки проводились за допомогою програмного пакету Gaussian 03 та менеджера функцій GaussView05 методом Хартрі-Фока при використанні базису 6-31G. Дослідження квантово-хімічних та фармакологічних властивостей мелоксикаму проводили методом молекулярної механіки MM+ та напівемпіричним методом РМЗ. Усі розрахунки проводилися за допомогою алгоритму спряженого градієнта Полака-Ріб'єра.

У розділі представлені методики та умови приготування зразків, а також концентрації препаратів, білків і наноструктур у вихідних розчинах. Окрім цього, було описано основні експериментальні та теоретичні методики, а також фізичні механізми, покладені в основу вимірювання досліджуваних в роботі об'єктів.

У **розділі 3** представлені результати квантово-хімічних розрахунків характеристик молекул нестероїдного протизапального препарату (НПЗП) мелоксикаму та алкалоїдів коніума з огляду на найближче оточення молекули, визначено вплив середовища на енергетичні та оптичні властивості молекули та проведено порівняння з експериментально отриманими спектрами.

Результати розрахунків показують, що мелоксикам можна віднести до до "м'яких" молекул, що здатні найбільш активно вступати в реакції з собі подібними молекулами. У першу чергу це стосується залишків амінокислоти цистеїну у складі білків і глутатіону.

Використовуючи метод Хартрі-Фока та модель самоузгодженого поля для врахування розчинника, були розраховані значення енергії, дипольні моменти та

відповідні коливні спектри основних алкалоїдів коніума. Вплив розчинника на спектр комплексу γ -коніцеїн-фулерен C_{60} представлено у вигляді порівняння розрахованих коливних спектрів у вакуумі та у воді на Рис.1.

Результати розрахунків, отримані в даній роботі, порівнювалися з експериментально отриманими та розрахованими в літературі у вакуумі. Експериментальні спектри ІЧ-поглинання для коніума, фулерена C_{60} та їх суміші у водному середовищі (див. Рис. 2) підтверджують можливість утворення адукту γ -коніцеїн – C_{60} , завдяки наявності в молекулі даного алкалоїду подвійного зв'язку $C=N$.

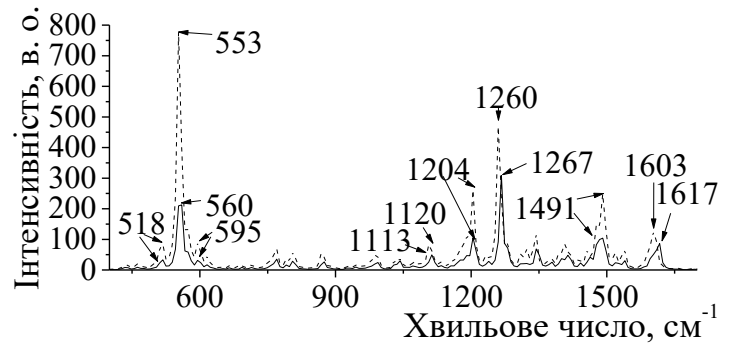


Рис. 1. Розраховані ІЧ-спектри адукта γ -коніцеїн- C_{60} -FAS у водному розчині (штрихована лінія) та у вакуумі (суцільна лінія).

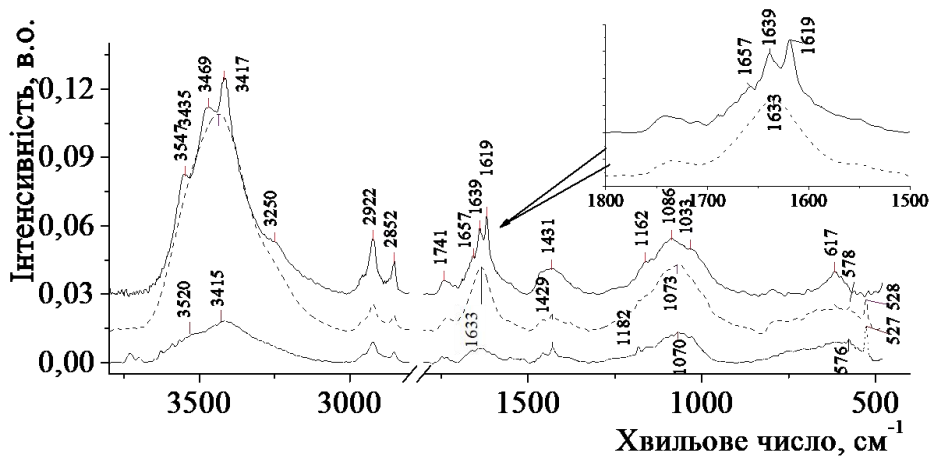
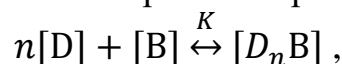


Рис. 2. Спектри ІЧ-поглинання коніума (суцільна лінія), розчину у воді 0,05 мл коніума+0,2 мл C_{60} (штрихована лінія) і молекул C_{60} (точкова лінія)

Помітними є зміни в спектрах для наведених молекул та їх суміші. Так, в спектрі суміші зникають розщеплення смуг $1633, 3435 \text{ cm}^{-1}$, характерні для молекул коніума, що пов'язано з виникненням взаємодії, яка реалізується за рахунок розриву подвійного зв'язку $C=N$ молекули γ -коніцеїну та молекули C_{60} , в результаті чого утворюється ковалентний зв'язок між молекулами.

У розділі 4 висвітлено результати дослідження електронних властивостей протипухлинного препарату доксорубіцину, а також механізмів його взаємодії з білком БСА в присутності наноструктур золота за допомогою квантово-хімічних обчислень та спектроскопії оптичного поглинання.

За використання розрахункових методів показано, що поглинання світла ДР відбувається переважно за рахунок $\pi \rightarrow \pi^*$ переходів в спряженій гетероциклічній системі молекули, однак незначний вклад в спектр поглинання вносять смуги, ближчі до ІЧ області, обумовлені переходами типу $n \rightarrow \pi^*$. При додаванні БСА до розчину доксорубіцину можна спостерігати зміни в спектрі доксорубіцину в області максимуму 481 nm , що дозволяє визначити константу зв'язування K молекул доксорубіцину і БСА в розчинах. Для цього необхідно записати рівняння рівноваги складових в розчині:



де $[D]$, $[B]$, $[D_2B]$ – концентрації вільних молекул доксорубіцину та альбуміну і тих, що знаходяться в комплексах відповідно, n – кількість місць зв'язування складових молекул розчину.

При постійній концентрації доксорубіцину та підвищенні вмісту макромолекул БСА в розчинах від 0 до значення рівного концентрації ДР (співвідношення концентрацій 1:1) спостерігаються такі залежності оптичної густини в максимумі спектру від співвідношень концентрації (Рис.3).

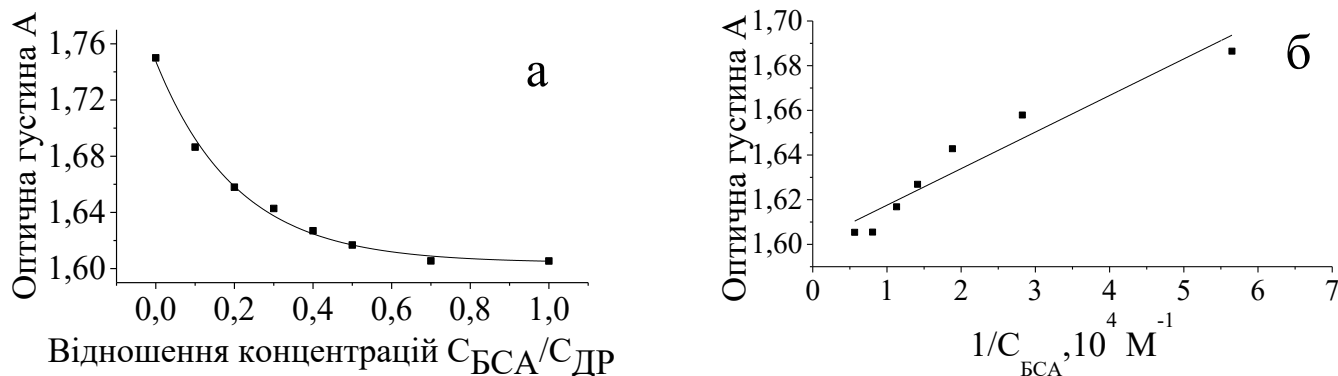


Рис. 3. Залежність оптичної густини в положенні $\lambda_{\max}=481$ нм для розчинів у воді молекул доксорубіцину і БСА від співвідношення концентрацій C_{BSA}/C_{DR} (а) від оберненої концентрації $1/C_{BSA}$ (б)

При екстраполяції кривої на Рис.3 б на вісь ординат таким чином, що $1/C_{BSA} \rightarrow 0$ ($C_{BSA} \rightarrow \infty$) перетин з віссю ординат дає значення оптичної густини комплексів A_K , обумовлене поглинанням світла молекулами доксорубіцину, що знаходяться в гетероасоціатах при $\lambda_{\max}=481$ нм. Значення A_K дорівнює 1,601.

Число місць зв'язування БСА з молекулами доксорубіцину n можна визначити за допомогою методу ізомольярних серій. Даний метод передбачає дослідження залежності різниці оптичних густин в положенні максимума розчину ДР та розчину ДР з БСА $A_0 - A$ від відношення молярної концентрації доксорубіцину до сумарної молярної концентрації компонент в розчині $C_{DR}/(C_{DR}+C_{BSA})$, (див. Рис. 4). Сумарна концентрація молекул ДР і БСА в розчинах у воді залишалася постійною і дорівнювала 2×10^{-4} М.

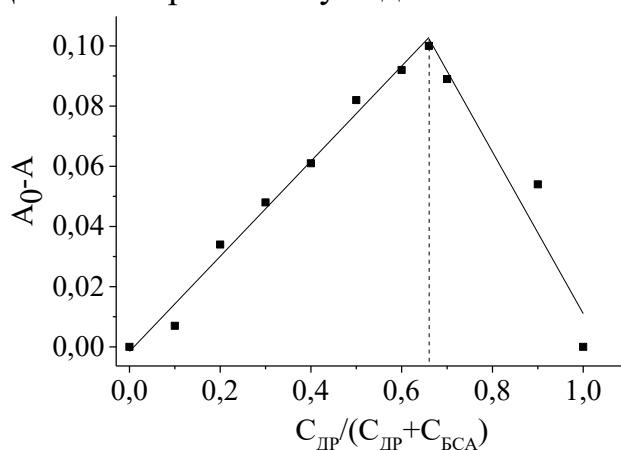


Рис. 4. Залежність різниці оптичних густин розчинів у воді доксорубіцину і БСА від відношення їх концентрацій представлена при збереженні сумарної молярної концентрації компонент $C_{BSA}+C_{DR}=2 \cdot 10^{-4}$ М (Т=296 К, рН 6,88).

Використовуючи закон Бугера-Ламберта-Бера оптична густина в спектрах описується такою залежністю:

$$A = A_0 + A_K = \varepsilon_0[D] + \varepsilon_K[D_2B]$$

За допомогою знайдених характеристик та вказаних співвідношень отримано значення константи стійкості комплексів ДР і БСА $K_C=7,56 \times 10^6 \text{ M}^{-2}$.

Порівнюючи отримані результати з літературними даними, можна стверджувати, що гетероасоціати ДР-БСА за таких високих значень константи K_C є достатньо стабільними, що сприятиме транспорту розглянутого антибіотика за допомогою макромолекул альбуміну, як

наслідок значного міжмолекулярного зв'язування.

Відомо, що перехід до аніонної форми молекули доксорубіцину супроводжується зсувом смуги поглинання молекулами доксорубіцину в бік більш довгих хвиль, що і спостерігається в різницеєвих спектрах розчину молекул антибіотика і наночастинок золота (Рис.5 крива 1). Особливо істотних змін спектр розчину для вказаних компонент зазнає в області довжин хвиль 550-650 нм. На Рис. 5 наведено спектри різниці оптичних густин ΔA кожного з спектрів розчинів з AuНЧ ($A_{\text{ДР-AuНЧ}}$ або $A_{\text{ДР-AuНЧ-БСА}}$) та адитивними сумами спектрів $A_{\text{ДР}}+A_{\text{AuНЧ}}$, або $A_{\text{ДР}}+A_{\text{AuНЧ}}+A_{\text{БСА}}$, відповідно.

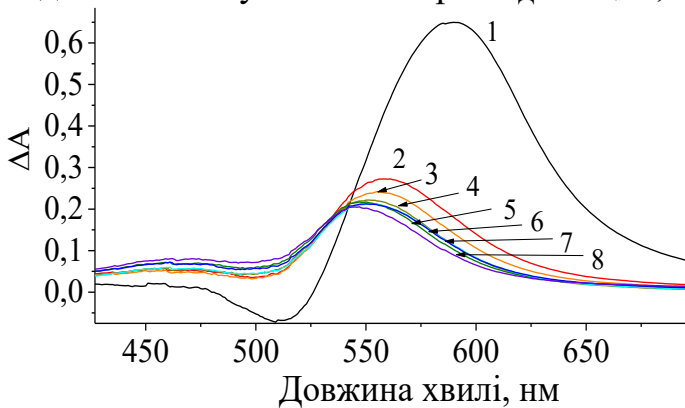


Рис. 5. Спектри різниці оптичних густин ΔA для розчинів у воді молекул доксорубіцину ($C_{\text{ДР}}=1,33 \times 10^{-4} \text{ M}=\text{const}$), і наночастинок золота ($C_{\text{AuНЧ}}=0,125 \text{ нМ}=\text{const}$) (1) та при подальшому додаванні біомолекул БСА з концентраціями $C_{\text{БСА}}=1,37$ (2), $C_{\text{БСА}}=2,61$ (3), $C_{\text{БСА}}=3,98$ (4), $C_{\text{БСА}}=5,34$ (5), $C_{\text{БСА}}=6,59$ (6), $C_{\text{БСА}}=9,32$ (7), $C_{\text{БСА}}=13,3$ (8) $\times 10^{-5} \text{ M}$.

Аналіз даних на Рис.5 показує, що вже за найменшого вмісту молекул альбуміну ($C_{\text{БСА}}=1,37 \times 10^{-5} \text{ M}$), максимум смуги біля $\lambda_{\text{max}}=550 \text{ нм}$ зміщується в бік менших довжин хвиль при зростанні вмісту БСА. Складні перетворення спектрів оптичного поглинання молекул доксорубіцину в розчинах у воді в присутності молекул альбуміну та AuНЧ, породжена зміною протонуваних форм, утворенням кон'югатів впливає на третинну структуру біомолекул БСА, що супроводжується перебудовою вмісту конформаційних компонент молекул альбуміну, що в свою чергу впливає на параметри зв'язування при гетероасоціації з молекулами доксорубіцину [23–30].

У водних розчинах молекул доксорубіцину, БСА, золотих наночастинок виникають додаткові механізми гетероасоціації БСА-ДР, обумовлені процесами біокон'югації AuНЧ з вказаними молекулами. При цьому взаємодія наночастинок з молекулами доксорубіцину приводить до їх агрегації і утворення осаду за рахунок пошкодження цитрованої стабілізуючої оболонки наночастинок золота. В свою чергу адсорбція на частинках AuНЧ біомолекул протеїну БСА, навпаки, сприяє ізоляції наночастинок, внаслідок чого відбувається відновлення колоїдного розчину у воді, при якому концентрація AuНЧ стає більш однорідною по всьому об'єму розчину. Всі вказані процеси впливають на кінетику біокон'югації і, як наслідок, гетероасоціації молекул і тому результати їх комплексоутворення істотно залежать від часу, що пройшов після приготування розчинів. Якщо час витримки розчинів значний, то параметри гетероасоціації будуть відрізнятися від тих, коли вказані параметри визначаються безпосередньо після приготування розчинів.

У **п'ятому розділі** приділяється увага розкриттю механізмів гетероасоціації ДР, БСА та AuНЧ в розчинах та плівках.

Специфічні залежності оптичної густини розчинів ДР з БСА при різній концентрації AuНЧ наведені на Рис.6. Ці дані потрібні для більш глибокого розуміння рівноважних властивостей системи, наприклад, критичної концентрації AuНЧ, за якої система є нестабільною.

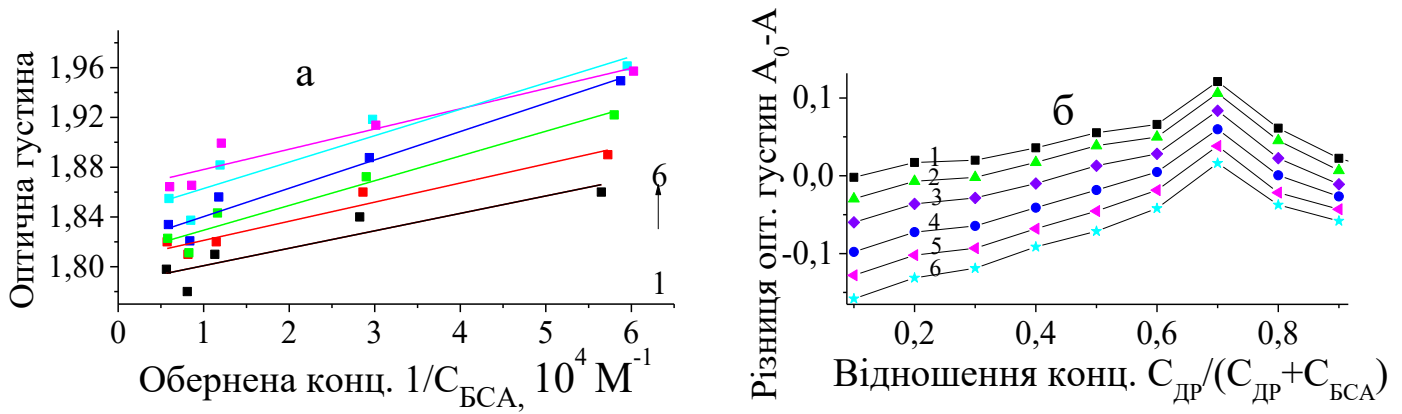


Рис. 6. Залежності оптичної густини розчинів у воді молекул ДР (C_{DR} 1,77 (1), 1,75 (2), 1,72 (3), 1,7 (4), 1,68 (5), 1,66 (6) $\times 10^{-4}$ М), AuНЧ та макромолекул БСА від оберненого відношення $1/C_{BSA}$ (а); Залежності різниці оптичних густин розчинів у воді молекул ДР, БСА і AuНЧ від відношення концентрацій молекул ДР, БСА (б) ($C_{AuNЧ}$ 0 (1), 0,66 (2), 1,3 (3), 1,92 (4), 2,53 (5), 3,1 (6) $\times 10^{-10}$ М).

Скориставшись отриманими величинами A_{K1} , A_{K2} , ϵ_{K1} , ϵ_{K2} для розчинів молекул ДР і БСА за відсутності AuНЧ та їх присутності отриманих за допомогою даних з Рис.6, відповідно, можна розрахувати значення $[D_2V]$, $[D]$, $[V]$ та константу стійкості K_C за відсутності і в присутності наночастинок золота. Значення констант K_C та параметри, необхідні для їх визначення наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри розчинів у воді молекул ДР, БСА, AuНЧ

C_{AuNPs} , 10^{-10} М	ϵ_K , $M^{-1} cm^{-1}$	$[D]$, 10^{-4} М	$[V]$, 10^{-4} М	$[D_2V]$, 10^{-6} М	K , $10^6 M^{-1}$
0	9227	1,72	0,78	0,11	4,74
0,66	9476	1,76	0,8	7,4	2,96
1,3	9589	1,82	0,83	3,26	1,18
2	9794	1,87	0,85	-	-
2,5	10018	1,95	0,89	-	-
3,1	10265	2,01	0,93	-	-
3,7	10466	2,09	0,97	-	-

Для обох типів розчинів ДР+БСА і ДР+БСА+AuНЧ величини $[D_0]$, $[V_0]$, $[D]$, $[V]$, A , A_K змінюються мало, що обумовлено з одного боку низькою концентрацією наночастинок золота в розчині, а з іншого – вимірюванням спектрів поглинання безпосередньо після приготування зразків. Водночас, помітними є зміни значень $[D_2V]$ і K_C . Так, в розчинах в присутності наночастинок концентрація комплексів зростає майже в 7 разів, а константа стійкості K_C обумовлена значним впливом AuНЧ на формування гетероасоціатів БСА-ДР. В першу чергу, причиною таких змін є адсорбція макромолекул БСА на наночастинок золота. Водночас, велике абсолютне значення K_C зберігається високим. Таким чином, в розчинах з AuНЧ реалізується кілька механізмів формування комплексів БСА-ДР. Один з них обумовлений безпосереднім зв'язуванням молекул БСА і ДР, а другий реалізується як зв'язування молекул ДР з макромолекулами протеїну, адсорбованими на наночастинок. Видно, що зменшення стійкості останніх комплексів супроводжується зростанням концентрації вільних молекул.

Варто відмітити, що лише для перших трьох розчинів з меншими концентраціями наночастинок S_{AuNCH} вдалося отримати додатні значення константи стійкості K_C . Видно, що з підвищенням концентрації S_{AuNCH} для перших трьох розчинів величина K_C падає, отже стійкість гетероасоціатів зменшується. Можна припустити, що золоті AuNCH перешкоджають утворенню комплексів БСА-ДР внаслідок взаємодії цих молекул з AuNCH золота.

З додаванням до розчину макромолекул БСА відбувається перебудова спектрів ІЧ-поглинання у діапазоні частот $1500-1800\text{ см}^{-1}$ в порівнянні з положеннями смуг поглинання БСА, відомими з літературних джерел (див. Рис.7). Зі збільшенням концентрації макромолекул БСА в цій області спостерігається зсув максимумів та перерозподіл інтенсивностей піків. Так, при найменшій концентрації білка в розчині чітко виявляються характеристичні смуги, які можна аналізувати та інтерпретувати, як конформаційні перетворення пов'язані з міжмолекулярними взаємодіями з молекулами ДР.

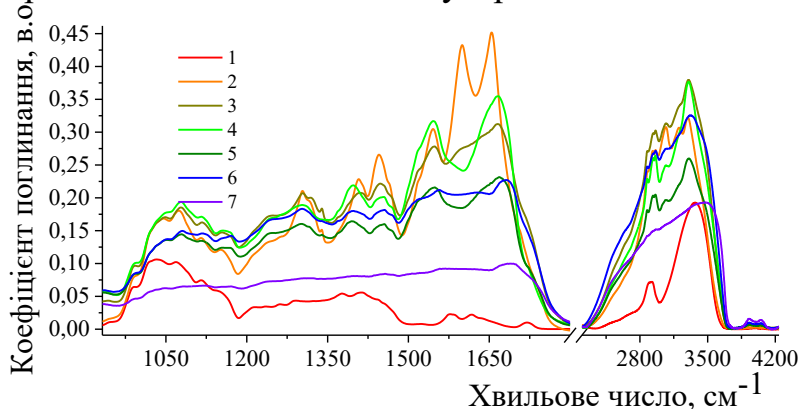


Рис. 7. Спектри ІЧ-поглинання для плівок розчинів у воді молекул ДР з концентрацією $S_{DR}=1,77 \times 10^{-4}\text{ M}=\text{const}$ та макромолекул БСА з концентраціями S_{BSA} 0 (1), 0,177 (2), 0,53 (3), 0,707 (4), 1,24 (5), 1,77 (6) $\times 10^{-4}\text{ M}$.

взаємодії з ДР, було проведено розклад отриманих спектрів у діапазоні поглинання аміду I $1500-1800\text{ см}^{-1}$ молекули БСА, яка описується шістьма основними конформаційними станами. У Таблиці 2 наведено відсоткові внески в спектри ІЧ чистого БСА з літератури та ДР з різним вмістом БСА від коливань різних типів вторинної структури аміду I БСА, ароматичних кілець та аміногрупи $\delta N-H$ молекули ДР.

Таблиця 2

Зміна вмісту конформаційних складових макромолекул БСА в гетероасоціатах БСА-ДР при концентраціях $S_{DR}=17,7 \times 10^{-5}\text{ M}$, БСА 1,82 (1), 3,48 (2), 5,3 (3), 7,12 (4), 12,42 (5), 17,7 (6) ($\times 10^{-5}\text{ M}$)

Відсотковий вміст Тип структури	БСА, % [31]	(1), %	(2), %	(3), %	(4), %	(5), %	(6), %
C=C аром. кілець		25,0	11,5	0,8	1,1	1,8	6,0
β лист	16	16,6	16,1	7,4	15,3	12,9	-
Вип. витки	6	-	-	-	-	-	-
α спіраль	63	40,6	32,6	54,9	33,8	20,3	24,4
поворот	12	-	-	1,8	4,8	3,6	12,4
β антипарал.	3	6,0	19,1	29,3	33,9	37,6	19,8
$\delta N-H$		11,8	20,7	5,9	11,1	23,8	37,4

Можна помітити, що в усіх спектрах зразків ДР-БСА з'являється вклад в області 1578-1600 см^{-1} , який відсутній в спектрі БСА, згідно літературним даним. Смуги в цьому діапазоні відповідають коливанням кілець молекули ДР. Окрім цього, після додавання до БСА доксорубіцину спостерігається поява смуг низької інтенсивності в області 1700-1730 см^{-1} , що відповідає деформаційному типу коливання групи $\delta\text{N-H}$, при чому частота максимуму даного коливання зростає зі зростанням концентрації БСА в зразку.

Бачимо, що внесок конформації випадкових витків в спектр амідів I з ДР практично нівелюється. Між тим, вклад коливань $\text{C}=\text{C}$ зв'язків системи кілець молекули ДР стрімко падає зі збільшенням концентрації БСА, однак після значення $C_{\text{БСА}}=5,3 \times 10^{-5}$ М тенденція змінюється в протилежний бік. Аналогічна ситуація складається для смуги $\delta\text{N-H}$ доксорубіцину, але з відмінністю у значеннях інтегральної інтенсивності: якщо коливання $\text{C}=\text{C}$ відновлюються приблизно на 24% від початкового значення, то інтенсивність коливання аміногрупи $\delta\text{N-H}$, після падіння вдвічі, підсилюється більше ніж втричі від початкового значення, при найменшій концентрації БСА. Також при даному співвідношенні концентрацій $C_{\text{БСА}}/C_{\text{ДР}}$ спостерігається локальний максимум інтегральної інтенсивності коливання α -спіралі амідів I макромолекули БСА, а вміст конформації повороту альбуміну досягає мінімуму 1,8% та повертається до початкового значення для $C_{\text{ДР}}/C_{\text{БСА}}=1$. Внесок β -антипаралельної конформації БСА зростає зі зростанням вмісту БСА і починає падати при однаковій концентрації молекул ДР і БСА у вихідному розчині.

Складні спектральні перетворення спостерігаються при додаванні до розчинів у воді молекул ДР і ДР-БСА наночастинок золота (див. Рис. 8). Зміни в спектрах ІЧ і, відповідно, зміни конформаційних характеристик потрійної системи ДР-БСА- AuНЧ відслідковувалась за допомогою розкладу на піки Гаусса спектру плівкового зразка потрійної системи ДР-БСА- AuНЧ з найменшою концентрацією БСА в області навколо амідів I, в якому смуги розділені найчіткіше. Результат представлено на Рис. 8.

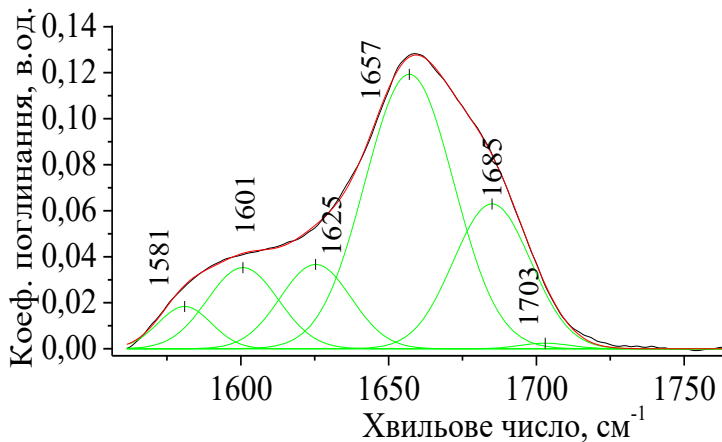


Рис.8. Спектри ІЧ плівок в області амідів I ДР з БСА після додавання до розчину AuНЧ , $C_{\text{AuНЧ}}=0,125 \times 10^{-9}$ М ($C_{\text{БСА}}/C_{\text{ДР}}=0,1$)

За результатами розрахунків було знайдено інтегральні інтенсивності піків Гаусса, що відповідають відсотковим внескам від коливних станів. При збереженні співвідношення $C_{\text{БСА}}/C_{\text{ДР}}=0,1$, значення залишаються приблизно однаковими для зразків за відсутності та в присутності AuНЧ для всіх коливних спектрів, окрім вмісту β антипаралельної конформації, який суттєво зростає після додавання AuНЧ , від 6% до 22,5 %, та вмісту $\delta\text{N-H}$ коливання, що спадає від 11,8% до 0,6%.

Для коливання $\text{C}=\text{C}$ аром. кілець – 16%, β листи – 12%, випадкові витки – 0%, α спіраль – 48,9 %, поворот – 0%.

Докінг-моделювання макромолекули БСА вказує на певний розподіл гідрофобних та інших залишків амінокислот, який впливає з вторинної та третинної структур молекули протеїну. В свою чергу, такий розподіл визначає локалізацію в межах макромолекули БСА молекули ДР при утворенні гетероасоціатів (див. Рис. 9). Молекула ДР

розміщується на відстанях $r_1=1,46$ нм $r_2=2$ нм від залишків амінокислот Trp212 та Trp134, відповідно.

Близьке розміщення молекул ДР до залишків амінокислот триптофану, як флуоресцентних хромофорів, створює умови для перенесення енергії збудження цих залишків, як донорних складових, до молекули ДР як акцепторної складової у випадку утворення міжмолекулярного гетероасоціату БСА-ДР. Такий процес міграції енергії має супроводжуватися гасінням ФЛ макромолекули БСА, що дійсно спостерігається в експериментально отриманих спектрах флуоресценції.

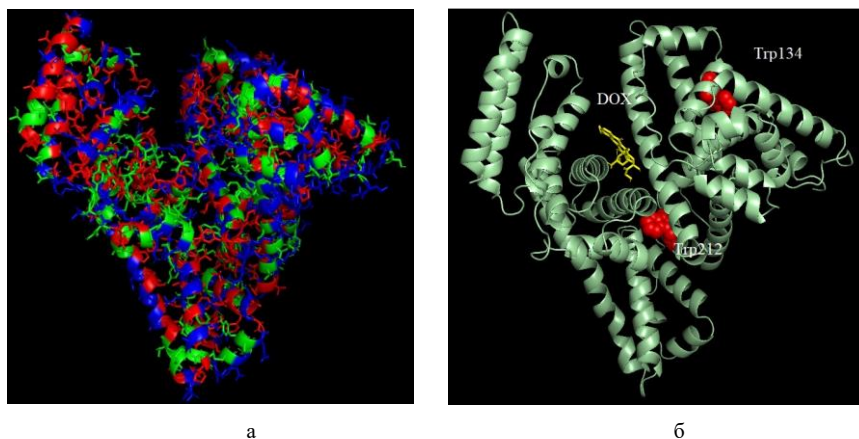


Рис. 9. Розподіл гідрофобних (червоний колір), полярних незалежних (зелений колір) і заряджених (синій колір) залишків амінокислот в біомолекулі протеїну БСА (а) та локалізація молекули ДР (жовтий колір) поблизу залишків амінокислот триптофану Trp212 та Trp134 (червоний колір) (б).

У відповідності до теорії Фьорстера ступінь безвипромінювального резонансного перенесення енергії залежить від відстані між молекулами донора і акцептора r та відстані R_0 , за якої ступінь перенесення енергії між ними E складає 50% і може бути представлений у вигляді:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6},$$

де F_0 , F – інтенсивності флуоресценції в максимумі смуги емісії λ_{\max} молекули донора (БСА) у відсутності та присутності молекул гасника (ДР), відповідно, R_0 – характеристична (критична) відстань Фьостера.

Умова перенесення енергії в теорії Фьорстера встановлює певне співвідношення нерівності між r і R_0 : $0,5R_0 < r < 1,5R_0$. В свою чергу, значення R_0 залежить від інтеграла перекриття та інших параметрів у відповідності до наступного рівняння:

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} k^2 \Phi J N^{-4},$$

де k^2 – фактор просторової орієнтації молекул, який для системи ДР-БСА дорівнює $2/3$, N є показником заломлення середовища, який для вказаної системи дорівнює $1,336$, $\Phi = 0,118$. Значення Φ відповідає квантовому виходу донора (ДР) за відсутності акцептора (БСА). Для розрахунку величини R_0^6 вибрано наступні величини у випадках систем ДР-БСА $k^2 = \frac{2}{3}$, $\Phi = 0,15$, $N = 1,35$, $I = 4,01 \times 10^{-15} \text{ см}^3 \text{ М}^{-1}$. Значення $R_0 = 2,2$ нм за величини $E = 0,2$, відстань між компонентами асоціату $r_0 \approx 2,81$ нм.

Величина інтегралу перекриття спектрів ФЛ $F(\lambda)$ донорних макромолекул (БСА) та поглинання $\epsilon(\lambda)$ акцепторних молекул (ДР) може бути визначена з наступного співвідношення:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \xi(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda}$$

де $F(\lambda)$ і $\xi(\lambda)$ – спектри ФЛ і поглинання (молярного коефіцієнта екстинкції). Скориставшись наведеними значеннями k_2 , Φ , J , N можна оцінити відстань R_0 , яка виявилася рівною $R_0=3,5$ нм. З використаних значень F/F_0 ступінь перенесення енергії складає величину $E=0,28$. Скориставшись значеннями E і R_0^6 було проведено оцінку відстані r , що дорівнює $r=4,1$ нм. Оскільки емісія ФЛ макромолекул БСА відбувається за рахунок ФЛ залишків амінокислот триптофану, то r представляє середнє значення відстані молекули ДР до залишків амінокислот Trp212 та Trp134. За вказаної величини $r=4,1$ нм умова Фьорстера виконується, що підтверджує можливість перенесення енергії збудження як наслідок міжмолекулярної взаємодії з формуванням гетероасоціатів БСА-ДР.

Аналіз гасіння ФЛ в максимумі смуги дозволяє визначити константу швидкості гасіння K_q , величина якої в свою чергу залежить від механізму взаємодії молекул гасника з молекулою флуорофора. Константу швидкості гасіння K_q було встановлено за допомогою рівняння Штерна-Вольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q_0],$$

де F_0 і F є величини інтенсивності флуоресценції розчинів, в даному випадку ДР-БСА, в максимумі смуги ФЛ лікарського препарату у відсутності та в присутності макромолекул протеїну БСА, відповідно, τ_0 – усереднений час життя молекул флуорофора у відсутності гасника (для молекул ДР це значення дорівнює 6 нс [31], $[Q_0]$ – концентрація гасника. З іншого боку, відомо, що $K_q \tau_0 = K_{SV}$, де K_{SV} – константа гасіння ФЛ Штерна-Вольмера. Для визначення K_{SV} було використано графічно побудовану залежність відношення інтенсивностей ФЛ $\frac{F_0}{F}$ від концентрації молекул ДР C_{DR} в розчинах за різних температур, яка апроксимується прямою Штерна-Вольмера. Значення констант K_{SV} і K_q для розглянутих температур представлено в таблиці 3.

Таблиця 3
Константи швидкості гасіння ФЛ K_q та константа Штерна-Вольмера K_{SV}
за різних температур розчинів у воді молекул БСА і ДР

T(K)	K_q ($M^{-1}c^{-1} \times 10^{12}$)	$K_{SV} 10^4 M^{-1}$	R
293	1,99	1,99	0,9493
303	1,62	1,62	0,9735
313	1,63	1,63	0,9656

Утворення гетероасоціатів є наслідком міжмолекулярної взаємодії, яка в теорії Хілла описується двома параметрами зв'язування, а саме константою зв'язування K_A і числом місць зв'язування молекул n . В згаданій теорії параметри зв'язування комплексів K_A і n можна визначити скориставшись модифікованим рівнянням Штерна-Вольмера:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg [Q_0]$$

де K_A – константа спорідненості, n – число місць зв'язування в молекулі лікарського препарату з молекулами протеїну. Значення параметрів зв'язування K_A і n , отримані з результатів лінійної апроксимації залежності $\log \frac{F_0 - F}{F}$ від $\log [Q_0]$ за різних температур 293 К, 303 К і 313 К наведено Таблиці 4.

Таблиця 4

**Параметри міжмолекулярного зв'язування у водних розчинах молекул БСА і ДР
за різних температур**

T(K)	K_A, M^{-1}	n	R
293	1100000	1,45	0,9945
303	19000	1,04	0,9895
313	1860	0,79	0,958

Для розчинів ДР з БСА різної температури константа зв'язування набуває достатньо великого значення, особливо для $T=293$ К. Це означає, що вже за кімнатної температури відбувається активне формування стійких гетероасоціатів БСА-ДР.

За відомих значень констант зв'язування K_A для різних температур у відповідності до теорії Ван Гоффа [32] можна розрахувати зміни термодинамічних характеристик розчинів у воді молекул при утворенні між ними гетероасоціатів скориставшись відомим рівнянням:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Величина K_A зв'язана із змінами ентальпії ΔH , вільної енергії Гіббса ΔG таким чином:

$$\Delta G = -RT \ln K_A,$$

де R - газова стала.

Апроксимуючи залежність $\ln K_A$ від $1/RT$, можна визначити зміну ентальпії ΔH як кутовий коефіцієнт. Отримані термодинамічні параметри ΔG , ΔH , ΔS за різних температур представлено в Таблиці 5.

Таблиця 5

Зміни термодинамічних характеристик в розчинах у воді кон'югатів БСА-ДР

T(K)	$\Delta G, \text{Дж/Моль}$	$\Delta S, \text{Дж} \times \text{моль}^{-1} \text{К}^{-1}$	$\Delta H, \text{Дж/моль}$
293	-36000	-708,8	
303	-25000	-721,7	$-243,7 \times 10^3$
313	-18300	-720	

Залежно від знаку та величини зміни термодинамічних параметрів взаємодія в гетероасоціатах реалізується внаслідок присутності сил зв'язування різної природи. Так, велике від'ємне значення потенціалу Гіббса вказує, що в гетероасоціатах БСА-ДР вирішальну роль відіграє електростатична міжмолекулярна взаємодія. Водночас, з підвищенням температури така взаємодія зменшується. Разом з тим, одночасно від'ємні значення ΔS і ΔH вказують на присутності в гетероасоціатах Ван-дер-Ваальсової взаємодії. В порівнянні з гетероасоціатами БСА з іншими молекулами, в комплексах БСА-ДР меншим є вплив гідروفобної взаємодії.

ВИСНОВКИ

1. Квантово-механічні розрахунки показують значення абсолютної жорсткості ($\eta=4,12$ eV), що дозволяє віднести даний препарат до ліків з високою фармакологічною активністю.

2. Квантово-хімічні розрахунки для коніуму у водному середовищі та вакуумі вказують на незначну перебудову електронної структури при зростанні дипольного моменту майже вдвічі у воді. Коливний спектр коніуму може розглядатися як сумарний спектр його алкалоїдів та істотно залежить від оточуючого середовища.

3. В спектрі ІЧ-поглинання коніуму для системи коніум- C_{60} спостерігається розщеплення смуг біля 1633 та 3435 cm^{-1} , що є наслідком утворення їх комплексів і супроводжується перебудовою конформаційних станів γ -коніцеїну.

4. Квантово-хімічні розрахунки абсолютної жорсткості молекули доксорубіцину $\eta=3,455$ eV дозволяють віднести її до м'яких молекул, що легко вступають у взаємодію з білками.

5. Результати вивчення оптичної густини розчинів у воді молекул доксорубіцину з БСА вказують на їх комплексоутворення з константою стійкості $K_C=7,56 \cdot 10^6$ M^{-2} і числом місць зв'язування $n=2$. За малого вмісту золотих наночастинок $C_{AuHCl}=10^{-10}$ M константа стійкості зменшується до величини $K_C=2,99 \cdot 10^6$ M^{-2} при збереженні значення n .

6. Додавання до водних розчинів БСА-ДР цитрованих наночастинок призводить до зміни протонованої форми молекул препарату від монокатіонної до двоаніонної форми, що в подальшому призводить до агрегації наночастинок, які стабілізуються БСА.

7. Додавання до водних розчинів БСА з ДР наночастинок золота призводить до істотних змін конформаційних станів молекул альбуміну, а саме: від 6% до 22,5% вмісту β -антипаралельної конформації, від 16,6% до 12% вмісту конформації β -листа та від 40,6% до 48,9% зростання вкладу α -спіралі.

8. В розчинах у воді при постійній концентрації БСА збільшення вмісту доксорубіцину призводить до гасіння флуоресценції і константа швидкості гасіння Штенра-Вольмера становить $1,99 \cdot 10^{12}$ M^{-1} , що свідчить про статичний характер утворення гетероасоціатів транспортного білка і медичного препарату. Константа зв'язування Хілла $K_A=1,1 \cdot 10$ M^{-1} і $n=1,45$. Підвищення температури від 293 К до 303 К і 313 К призводить до зменшення констант зв'язування при збереженні числа n .

9. Докінг-моделювання показує, що гасіння флуоресценції є наслідком близького розташування молекул ДР поблизу залишків амінокислот триптофану. У відповідності до теорії Фьорстера встановлено, що середня відстань між молекулами ДР та Trp134 і Trp 212 дорівнює $r=4,1$ нм при ступені безвипромінювальної резонансної передачі енергії $E=0,28$ та інтегралі перекриття спектрів поглинання та флуорисценції $J=1,5 \cdot 10^{16}$ $cm^{-1}M^{-1}$.

10. Використання константи зв'язування K_A за різних температур показало, що зміна термодинамічних параметрів складає для ентальпії $\Delta H=-243,7 \cdot 10^3$ Дж/моль, потенціалу Гіббса $\Delta G=-3,6 \cdot 10^4$ Дж/моль, ентропії $\Delta S=-708,8$ Дж \times моль $^{-1}$ К $^{-1}$. Вказані значення свідчать, що переважаючою в комплексах БСА і ДР є електростатична взаємодія.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Goncharenko N.A.**, Pavlenko O.L., Dmytrenko O.P., Kulish M.P., Lopatynskiy A.M., Chegel V.I. Gold nanoparticles as a factor of influence on doxorubicin–bovine serum albumin complex // *Appl. Nanosci.* Springer International Publishing, 2019. Vol. 9, № 5. P. 825–833.
2. Bulavin L.A., **Goncharenko N.A.**, Dmytrenko O.P., Pavlenko O.L., Kulish M.P., Goncharova O., Demydov P. V, Lopatynskiy A.M., Chegel V.I. Heteroassociation of antitumor agent doxorubicin with bovine serum albumin in the presence of gold nanoparticles ☆ // *J. Mol. Liq.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 284. P. 633–638.
3. **Goncharenko N.A.**, Pavlenko O.L., Dmytrenko O.P., Kulish M.P., Lopatynskyy A.M., Goncharova O.O., Tsegelna A. V, Demydov P. V, Chegel V.I. Understanding prodrugs: complexation in aqueous solutions of doxorubicin, bovine serum albumin and gold nanoparticles // *Appl. Nanosci.* 2020. Vol. 10. P. 2941–2949.
4. **Goncharenko N.A.**, Dmytrenko O.P., Pavlenko L., Kulish M.P., Pundyk I.P., Lesyuk I., Busko T.O., Lopatynskiy, Chegel V.I., Lytvyn V.K., Kaniuk M.I. Complexation peculiarities in “Doxorubicin–Bovine serum albumin–gold nanoparticles” heterosystem. The fluorescence study // *Ukr. J. Phys.* 2020. Vol. 65, № 6. P. 468–475.
5. **Полуян Н.А.**, Заболотный М.А., Момот А.І., Довбешко Г.І., Гнатюк О.П., Кіркільєвська Л.М. Модифікація властивостей онкопрепарату коніум за допомогою фулерену C60 // *Med. Phys. - Curr. status, Probl. W. Dev. Innov. Technol.* 2013. P. 106–112.
6. Заболотний М.А., **Полуян Н.А.**, Довбешко Г.І., Кондрацький Ю.М., Куліш М.П., Момот А.І., Дмитренко О.П. Вплив молекулярного оточення на властивості алкалоїдів протипухлинного препарату Коніум // *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології.* 2014. Vol. 12, № 4. P. 651–664.
7. Zabolotnyi M.A., Prylutskyu Y.I., **Poluyan N.A.**, Evstigneev M.P., Dovbeshko G.I. Conformational, IR spectroscopic and electronic properties of conium alkaloids and their adducts with C60 fullerene // *J. Mol. Struct.* Elsevier, 2016. Vol. 1118. P. 167–171.
8. Zabolotnyu M., Dovbeshko G., Solyanyk G., Kondratskyu Y., Estrela-Lyopis V., Kulysh M., Dmytrenko O., Busko T., **Poluyan N.** Main problems of anticancer drugs modification // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.* 2014. *Радіофізика*, № 21–22. P. 42–44.
9. Syrovaya A.O., **Goncharenko N.A.**, Levashova O.L., Chalenko N.N. Investigation of quantum-chemical properties of Meloxicam // *Sci. Herit. (Budapest, Hungary).* 2016. Vol. 1, № 1. P. 93–96.
10. Chekman, I.S. Syrovaya, A.O. Levashova O.L., Tishakova, T.S. Kozub, S.N. Chalenko N.N., **Honcharenko N.A.** Non-steroid anti-inflammatory drugs in quantum chemistry.-Kyiv/Kharkiv.”Planeta-print”Ltd. 2016. 84 p.
11. Заболотний М.А., Куліш М.П., Дмитренко О.П., **Полуян Н.А.**, Момот А.І., Довбешко Г.І., Гнатюк О.П., Кіркільєвська Л.М. Вивчення можливості модифікації структури та властивостей препарату коніум за допомогою водного розчину фулерену C60 // *Тезиси IV Междунар. науч. конф. Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии (НАНСИС–2013).* Київ, 2013. P. 525.
12. **Полуян Н.А.**, Заболотный М.А., Куліш М.П., Дмитренко О.П. Модифікація

властивостей препарату коніум за допомогою фулерену C₆₀ // Тези доповідей наукової конференції молодих вчених «Наука XXI сторіччя: сучасні проблеми фізики».- Київ, КНУ імені Тараса Шевченка, 2013. Р. 18–19.

13.Заболотний М.А., Куліш М.П., Дмитренко О.П., **Гончаренко Н.А.**, Момот А.І., Довбешко Г.І. Модифікація властивостей алкалоїдів протипухлинного препарату Коніум // Збірник тез 4-ї міжнародної конференції "Медична фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології ". Київ, 2014. Р. 18-19.

14.Dovbeshko G.I., Zabolotnyy M.A., **Poluyan N.A.**, Kulysh M.P., Dmytrenko O.P., Sagetdinov R.K. The effect of irradiated solvent on properties of antitumor antibiotic doxorubicin // book of abstracts of IV international conference “Nanobiophysics 2015: Fundamental and Applied Aspects.” Kyiv, 2015. P. 50.

15.**Полуян Н.А.**, Заболотный М.А., Довбешко Г.І. Модифікація властивостей протипухлинного препарату доксорубіцин за допомогою опромінення // Тези доповідей наукової конференції молодих вчених"Наука XXI сторіччя: сучасні проблеми фізики". Київ, КНУ імені Тараса Шевченка, 2015. Р. 36.

16.Заболотний М.А., **Полуян Н.А.**, Куліш М.П., Дмитренко О.П., Момот А.І., Стрельчук В.В., Довбешко Г.І. Модифікація властивостей протипухлинного препарату доксорубіцин // Матеріали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Хімія, фізика та технологія поверхні» спільно з семінаром «Наноструктуровані біосумісні/біоактивні матеріали». Київ, 2015. Р. 230.

17.Заболотний М.А., **Полуян Н.А.**, Довбешко Г.І., Куліш М.П., Дмитренко О.П., Мизников Д., Стрельчук В.В. Вплив розчинника на властивості протипухлинного антибіотику Доксорубіцин // Збірник тез 5-ї міжнародної конференції "Медична фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології ". Київ, 2015. Р. 46.

18.Заболотний М.А., **Гончаренко Н.А.**, Дмитренко О.П., Довбешко Г.І., Гнатюк О.П. Залежність спектральних властивостей молекули доксорубіцину від дози опромінення молекулярного оточення // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю YOUTHNANOBIOTECH-2016 молодіжний форум з нанобіотехнологій. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2016. Vol. 2, № спец. вип. 94. Р. 73.

19.**Goncharenko N.A.**, Dmytrenko O.P., Kulysh M.P., Pavlenko O.L., Zabolotnyy M.A., Chegel V.I., Lopatynskiy, A.M. Chekman I.S. Interaction of Doxorubicin with Bovine Serum Albumin Under Conditions of Photo-Induced Plasmonic Enhancement // Materials of the 5-th International conference “NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects.” 2017. P. 117.

20.**Гончаренко Н.А.**, Дмитренко О.П., Куліш М.П., Павленко О.Л., Стрельчук В.В., Коломис О.Ф., Насека В.М., Чекман І.С. Коливна структура та прояви взаємодії цефтриаксону з мембранними компонентами клітин бактерій // Збірник тез 6-ї міжнародної конференції "Медична фізика – сучасний стан, проблеми, шляхи розвитку. Новітні технології ". Київ, 2017. Р. 122.

21.Pavlenko O.L., Dmytrenko O.P., Kulysh M.P., Lopatynskiy, A.M. Chegel V.I., **Goncharenko N.A.** Creating of effective prodrugs: gold nanoparticles – doxorubicin – bovine serum albumin complex // Book of abstracts of International research and practice conference ‘ “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018).” Kiev, 2018. P. 56.

22.Tshehlna A.V., **Goncharenko N.A.**, Lopatynskyy, A M Dmytrenko O.P., Kulysh

M.P., Chegel V.I., Pavlenko O.L. Physico-chemical analysis of Doxorubicin-BSA interaction in the Au nanoparticles environment // Abstracts of 8th International Conference “Medical physics – the current status, problems, the way of development. Innovation technologies.” Kyiv, 2018. P. 190.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

23. Gao D., Tian Y., Bi S., Chen Y., Yu A., Zhang H. Studies on the interaction of colloidal gold and serum albumins by spectral methods // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2005. Vol. 62, № 4–5. P. 1203–1208.
24. Shang L., Wang Y., Jiang J., Dong S. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study // *Langmuir*. American Chemical Society, 2007. Vol. 23, № 5. P. 2714–2721.
25. Iosin M., Toderas F., Baldeck P.L., Astilean S. Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced Raman scattering // *J. Mol. Struct. Elsevier B.V.*, 2009. Vol. 924–926, № C. P. 196–200.
26. Naveenraj S., Anandan S., Kathiravan A., Renganathan R., Ashokkumar M. The interaction of sonochemically synthesized gold nanoparticles with serum albumins // *J. Pharm. Biomed. Anal. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 53, № 3. P. 804–810.
27. Iosin M., Canpean V., Astilean S. Spectroscopic studies on pH-and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles // *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier*, 2011. Vol. 217, № 2. P. 395–401.
28. Shi X.J., Li D., Xie J., Wang S., Wu Z.Q., Chen H. Spectroscopic investigation of the interactions between gold nanoparticles and bovine serum albumin // *Chinese Sci. Bull. Springer*, 2012. Vol. 57, № 10. P. 1109–1115.
29. Chaudhary A., Gupta A., Khan S., Nandi C.K. Morphological effect of gold nanoparticles on the adsorption of bovine serum albumin // *Phys. Chem. Chem. Phys. The Royal Society of Chemistry*, 2014. Vol. 16, № 38. P. 20471–20482.
30. Alsamamra H., Hawwarin I., Sharkh S.A., Abuteir M. Study the Interaction between Gold Nanoparticles and Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Approach // *J. Bioanal. Biomed. OMICS Publishing Group*, 2018. Vol. 10, № 2.
31. Agudelo D., Bourassa P., Bruneau J., Bérubé G., Asselin É., Tajmir-Riahi H.A. Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 8. P. 1–13.
32. Markarian S.A., Aznauryan M.G. Study on the interaction between isoniazid and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy: The effect of dimethylsulfoxide // *Mol. Biol. Rep.* 2012. Vol. 39, № 7. P. 7559–7567.

АНОТАЦІЯ

Гончаренко Н.А. **Гетероасоціація коніум-С₆₀ та доксорубіцин-альбумін-наночастинки золота** - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки). - Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київ, 2021.

Актуальність роботи визначається постійною потребою у вдосконаленні хіміотерапевтичних препаратів з огляду на різноманітну чутливість різних злоякісних клітин до дії препаратів, а також численні побічні реакції організму, що виникають в процесі лікування за рахунок їх токсичності. Оскільки протипухлинна активність сильно обмежена цими факторами, отримані результати можуть бути використані при розробці модифікованих форм хіміопрепаратів з метою зменшення їх токсичної дії на здорові тканини та подолання резистентності злоякісних клітин.

За допомогою методів ІЧ спектроскопії, фотолюмінесценції, УФ та видимої спектроскопії, квантово-хімічного та докінг-моделювання в роботі досліджено основні електронні, оптичні та конформаційні властивості алкалоїдів препарату коніум у водному середовищі та протипухлинного антибіотика доксорубіцину (ДР) у водних розчинах з транспортним білком бичачим сироватковим альбуміном (БСА).

Було описано механізми комплексоутворення алкалоїду в складі коніума γ -коніцеїну з фулереном C_{60} та гетероасоціації доксорубіцину і БСА в розчинах з наночастинками Au.

Ключові слова: доксорубіцин, альбумін, наночастинки, спектроскопія, флуоресценція, альбумін.

SUMMARY

Goncharenko N.A. **Heteroassociation of conium- C_{60} and doxorubicin-albumin-gold nanoparticles** - Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for the Academic Degree of the Candidate of physical and mathematical sciences in Speciality 03.00.02 - biophysics (physical and mathematical sciences). - Kyiv National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv 2021, National Taras Shevchenko University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

The urgency of the work is determined by the constant need for improving the chemotherapeutic drugs because of the different malignant cells sensitivity to the drugs` action and the side effects due to their toxicity occurring during the treatment. Because antitumor activity is severely limited by these factors, the results can be used in the development of modified forms of chemotherapeutics to reduce their toxic effects on healthy tissues and overcome the resistance of malignant cells.

Using quantum-chemical calculations, docking-modeling, IR-, Raman UV-vis spectroscopy and luminescence the main electron, optical and conformational characteristics of conium alkaloids in aqueous solution and antitumor antibiotic doxorubicin (DR) with transport protein bovine serum albumin (BSA) were studied.

There were proposed the mechanisms` of γ -coniceine alkaloid- C_{60} fullerene complexation and doxorubicin - BSA heteroassociation in solutions with Au nanoparticles.

Keywords: doxorubicin, albumin, nanoparticles, spectroscopy, fluorescence, albumin.

АННОТАЦИЯ

Гончаренко Н.А. Гетероассоциация Кониум-С₆₀ и доксорубицин-альбумин наночастицы золота. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 - биофизика (физико-математические науки). - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, МОН Украины, Киев, 2021, Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, МОН Украины, Киев, 2021.

Актуальность работы определяется постоянной потребностью в совершенствовании химиотерапевтических препаратов учитывая разнообразную чувствительность различных злокачественных клеток к действию препаратов, а также многочисленные побочные реакции организма, возникающие в процессе лечения за счет их токсичности. Поскольку противоопухолевая активность сильно ограничена этими факторами, полученные результаты могут быть использованы при разработке модифицированных форм химиопрепаратов с целью уменьшения их токсического действия на здоровые ткани и преодоления резистентности злокачественных клеток.

С помощью методов ИК спектроскопии, фотолюминесценции, УФ и видимой спектроскопии, квантово-химического и докинг-моделирования в работе исследованы основные электронные, оптические и конформационные свойства алкалоидов препарата Кониум в водной среде и противоопухолевого антибиотика доксорубицина (ДР) в водных растворах с транспортным белком бычьим сывороточным альбумином (БСА). В работе описаны механизмы комплексообразования алкалоида в составе Кониум γ -коницеину с фуллереном С₆₀ и гетероассоциации доксорубицина и БСА в растворах с наночастицами Au. Расщепление полос у 1633 и 3435 см⁻¹ в спектре ИК-поглощения кониума для системы кониум-С₆₀ является следствием образования их комплексов и сопровождается перестройкой конформационных состояний γ -коницеина. Используя методы электронной спектроскопии, показано, что в водных растворах доксорубицина с БСА происходит комплексообразование молекул с константой устойчивости $K_C = 7,56 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}$ и числом мест связывания $n = 2$. Добавление к водным растворам БСА-ДР цитратных наночастиц приводит к уменьшению константы устойчивости к величине $K_C = 2,99 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}$ при сохранении значения n и изменения протонированной формы молекул препарата от монокатионной к двоанионной формы, при дальнейшем росте концентрации приводит к агрегации наночастиц, которые стабилизируются БСА. Исследование спектров ИК-поглощения ДР с БСА указывает на изменения содержания конформационных состояний β -антипараллельной конформации от 6% до 22,5%, β -листа - от 16,6% до 12% и вклада α -спирали от 40,6% до 48,9% при увеличении концентрации молекул альбумина в растворах. Значение константы скорости тушения флуоресценции Штенра-Вольмера составляет $1,99 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ свидетельствует о статичном характере образования гетероассоциатов транспортного белка и медицинского препарата. Используя результаты измерения спектров флуоресценции при различных температурах, было рассчитано константы связывания

K_A , что позволило определить изменение термодинамических параметров энтальпии $\Delta H = -243,7 \cdot 10^3$ Дж/моль, потенциала Гиббса $\Delta G = -3,6 \cdot 10^4$ Дж/моль, энтропии $\Delta S = -708,8$ Дж \times моль $^{-1}$ К $^{-1}$ системы ДР-БСА. Указанные значения показывают, что преобладающим в комплексах БСА и ДР является электростатическое взаимодействие. Используя методы докинг-моделирования установлено, что среднее расстояние между молекулами ДР и Trp134 и Trp 212 равно $r=4,1$ нм при степени безызлучательной резонансной передачи энергии $E=0,28$ и интеграле перекрытия спектров поглощения и флуорисценции $J = 1,5 \cdot 10^{16}$ см $^{-1}$ М $^{-1}$. Тушение флуоресценции является следствием близкого расположения молекул ДР вблизи остатков аминокислот триптофана. Квантово-химические расчеты абсолютной жесткости молекулы доксорубина $\eta = 3,455$ эВ позволяют отнести ее к мягким молекулам, легко вступающим во взаимодействие с белками.

Ключевые слова: доксорубин, альбумин, наночастицы, спектроскопия, флуоресценция, альбумин.