

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ І
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

ШУЛЬГА СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ



УДК 665.372:577.352.27 – 46

**СТВОРЕННЯ ТРАНСПОРТНИХ НАНОСИСТЕМ НА ОСНОВІ
ЕСЕНЦІАЛЬНИХ ФОСФОЛІПІДІВ ОЛІЇ СОНЯШНИКА ДЛЯ ПОСИЛЕННЯ
БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ КУРКУМІНУ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є сукупність наукових статей

Роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України

Блюм Ярослав Борисович,
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
директор, завідувач відділу геноміки та молекулярної біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України, завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу

доктор біологічних наук, професор
Рибальченко Володимир Корнійович,
Інститут високих технологій Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, головний науковий співробітник

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник,

Прилуцька Світлана Володимирівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України, в.о. завідувачки кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

Захист дисертації відбудеться 05 травня 2021 р. об 11:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.
Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а та на сайті www.ifbg.org.ua.

Автореферат розісланий 03 квітня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради
к.б.н., доц.



Н. Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Європейська комісія склала програму (Nanoroadmap Medical and Health) Європейського Союзу найбільш важливих, на їхню думку, розділів з науково-дослідного і технологічного розвитку на 2020 – 2025 рр. нанобіотехнологій в біомедицині: 1) трансплантація органів і тканин, інженерія живих тканин, біосумісні імплантанти і регенеративна медицина; 2) інкапсуляція ліків і адресна доставка ліків; 3) створення нових лікарських засобів; 4) молекулярна візуалізація, молекулярні біосенсори, біочіпи і лабораторії на чіпи; 5) нові методи діагностики і лікування.

Інфільтрація запальних цитокінів, оксидативний стрес та хронічні запалення пов'язані з виникненням та розвитком цілої низки захворювань. З цієї причини лікування препаратами з антиоксидантними та протизапальними властивостями може бути доцільним для попередження або уповільнення розвитку цих розладів.

Відомо, що багато похідних рослинних метаболітів здатні безпосередньо впливати на медіатори запалення, а також на виробництво та активність вторинних месенджерів, факторів транскрипції та експресії прозапальних молекул, тим самим, пригнічуючи патологічні стани (Calixto et al., 2003; 2004; Yao et al., 2013). Поліфеноли, такі як флавоноїди, як відомо, є потужними антиоксидантами та протизапальними засобами, і серед усіх цих сполук було показано, що куркумін демонструє широкий спектр фармакологічної активності проти багатьох хронічних захворювань (Masuda et al., 2006, Egan et al., 2004). Куркумін не тільки пригнічує проліферацію та метастазування пухлинних клітин, але й індукує їх апоптоз, модулюючи декілька прозапальних факторів запалення (інтерлейкін IL1, IL1b, IL12), фактор некрозу пухлини α (TNF- α) та інтерферону γ (INF- γ) (Mohanty et al., 2012). Незважаючи на потенційну активність, біодоступність куркуміну обмежена його низькою розчинністю у воді (0,6 мг/мл) та його деградацією, швидкому перетворенню *in vivo* в глюкороніди та сульфати.

Таргетна доставка куркуміну може бути вагомою альтернативою класичним протоколам лікування. Для такої доставки потрібно мати відповідний засіб, оскільки у воді куркумін може утворювати агломерати. Можливою стратегією вдосконалення доставки куркуміну є завантаження у відповідні наноносії, які можуть покращити ефективність дії, локальне осадження та розподіл куркуміну. Такою системою доставки можуть слугувати ліпосоми – універсальні системи, до яких можна завантажувати як ліпофільні, так і гідрофільні сполуки.

В ряді робіт (Zaru et al., 2007, 2009; Liang et al., 2015; Manca et al., 2012, 2013) було проведено дослідження з завантаження кверцетину та куркуміну в везикули, що склались з фосфоліпідів і гліцерину (гліцеросоми). Отримані результати показали, що для поліпшення характеристик гліцеросом, завантажених кверцетином, потрібна велика кількість гліцерину і гідратація прямим додаванням водної дисперсії кверцетину або суміші гліцерин/вода для отримання гліцеросом. Дисперсія гліцеросом була дуже каламутною, як емульсія. Везикули були великими та сильно полідисперсними, кверцетин осаджувався відразу після отримання препарату, а куркумін одразу випадав в осад в процесі приготування гліцеросом.

Тому актуальним є завдання створення систем доставки активних фармацевтичних інгредієнтів, які виявляють погану розчинність у воді та низьку біодоступність, яка була б позбавлена цих недоліків. Така система доставки фармацевтично активних інгредієнтів як ліпосоми, утворені з рослинних або тваринних фосфоліпідів, практично повністю задовольняє цим вимогам.

Наразі, спостерігається поширення захворювань, які пов'язані зі зростанням тривалості життя населення та впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища. На жаль, досі медицина не має ефективних засобів лікування нейродегенеративної патології (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Гентінгтона). Більшість препаратів можуть лише трохи сповільнити перебіг хвороби, але нездатні зупинити руйнування синаптичних зв'язків і функціонування нейрональних мереж, які відповідають за когнітивні процеси і механізми пам'яті, що веде до слабоумства і смерті пацієнтів. (Duysckaerts et al., 2008). У зв'язку з цим існує нагальна необхідність дослідження молекулярних механізмів ініціації, перебігу і регуляції амілоїдогенезу з метою розробки нових науково обґрунтованих підходів до його лікування з використанням новітніх досягнень біомедицини. Підходи до терапії амілоїдозу і когнітивних порушень у випадку хвороби Альцгеймера, які зосереджені на пригніченні агрегації β -амілоїдного пептиду ($A\beta$) або на симптоматичній терапії, й дотепер не демонструють необхідної ефективності, тому актуальним є дослідження, спрямоване на вивчення назального застосування ліпосомальної форми куркуміну у випадку хронічного запалення, яке передуює і супроводжує маніфестацію амілоїдозу.

Відомо, що попередник β -амілоїдного пептиду ($A\beta PP$) у нейронах виконує багато різноманітних функцій: як транспортер окремих сполук по аксону до пресинаптичної мембрани, в ході неамілоїдогенного процесінгу з нього утворюються сигнальні пептиди, за амілоїдогенного процесінгу – генерується β -амілоїдний пептид та сигнальні пептиди апоптозу (Vassar et al., 2000). Назальна терапія ліпосомальною формою куркуміну, може дати змогу дозовано пригнічувати надлишковий синтез $A\beta PP$ і процесінг останнього за амілоїдогенним сценарієм (Sokolik et al., 2017).

Представлена робота присвячена комплексному дослідженню молекулярних та структурно біологічних механізмів специфічної взаємодії флавоноїдів (куркуміну і його похідних) з амілоїдними та мікобактеріальними пептидами. Основна увага була зосереджена на встановленні ролі ліпосомальних форм активних фармацевтичних інгредієнтів (куркуміну і його похідних) як інгібіторів процесів запалення та моделювання молекулярних та структурно-біологічних механізмів специфічної взаємодії амілоїдних пептидів і їх роль в розвитку хвороби Альцгеймера. Оскільки відомості щодо інгібіторів процесів запалення та молекулярних і структурно-біологічних механізмів специфічної взаємодії амілоїдних пептидів практично відсутні, результати таких досліджень представлятимуть істотний фундаментальний інтерес, а виявлення терапевтичного ефекту антизапальної дії куркуміну відкриє нові перспективи у пошуку новітніх біотехнологічних засобів для лікування хвороби Альцгеймера та обґрунтуванні клінічних підходів до сучасної протекторної терапії амілоїдної патології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота

виконана в рамках наукових програм відділу промислової та харчової біотехнології (пізніше - відділу геноміки та молекулярної біотехнології) Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»: українсько-японського проекту ДФФД України «Дослідження взаємодії куркуміну з клітинними мішенями та відбір і створення його функціонально ефективних форм» (№ ДР 0118U102391, 2018-2019 рр.); українсько-японського проекту ДФФД України «Дослідження прямого та непрямого радіаційного опромінення на біологічні системи» (№ ДР 0114U0052376, 2013-2014 рр.); українсько-турецького проекту НАН України «Одержання природних лецитинів та ліпосомальних наноемульсій з горіхів ліщини та олії соняшника» (№ ДР 0109U0000471, 2011-2012 рр.).

Мета та завдання дослідження: створення ліпосомальної форми куркуміну для подальшого пошуку та з'ясування механізмів його протизапальної активності та застосування як нового лікарського засобу у випадку нейродегенеративних захворювань.

Для досягнення поставленої мети до завдань роботи входило:

1. Розробити метод отримання сухого знежиреного лецитину (суміші фосфоліпідів) з олії соняшника. Визначити якісний та кількісний склад фосфоліпідів в суміші та можливість його регулювання, жирнокислотний склад фосфоліпідів.

2. Визначити методи створення ліпосомальних форм куркуміну і АТР з лецитину соняшника і їх розміри.

3. Визначити стабільність ліпосом з фосфоліпідів соняшника до ініційованого окиснення в порівнянні з ліпосомами з фосфоліпідів сої та яєчного жовтка.

4. Вивчити методом молекулярної динаміки специфіку взаємодії між β -амілоїдними пептидами в β -амілоїдних гексамерах та фібрилах і оцінити конформаційні зміни β -амілоїдних мономерів в нонамерах.

5. Вивчити вплив іонів Zn на структуру та електронні стани β -амілоїдних нонамерів.

6. Дослідити взаємодію куркуміну з сайтами рестрикції A β PP *in silico*.

7. Вивчити специфічні взаємодії між β -амілоїдними пептидами та похідними куркуміну і їх вплив (терапевтичний ефект) на розвиток хвороби Альцгеймера методом молекулярного моделювання.

8. Вивчити на моделі *in vitro* та *in vivo* доклінічного етапу хвороби Альцгеймера вплив гомоагрегатів β -амілоїдного пептиду A β (1-42) на суспензію мононуклеарів людини (модель *in vitro*) та на гіпокамп щурів (модель *in vivo*); вивчити на цих експериментальних моделях антиамілоїдогенну і протизапальну роль ліпосомальної форми куркуміну.

Об'єкт дослідження – процеси виділення, ідентифікації та кількісного визначення фосфоліпідів олії соняшника та створення ліпосом на їх основі; молекулярні та структурно-біологічні механізми специфічної взаємодії амілоїдних пептидів і куркуміна та їх роль в розвитку хвороби Альцгеймера;

Предмет дослідження – характеристики ліпосомальної форми куркуміну; агрегація комплексів амілоїдних пептидів та амілоїдних пептидів з куркуміном і його похідними; антизапальний ефект ліпосомальної форми куркуміну;

Методи дослідження включають фізико-хімічні, зокрема екстракцію рідину фосфоліпідів ацетоном з фосфатидного концентрату олії соняшника,

високоєфективну хроматографію (ВЕРХ) сухої суміші фосфоліпідів (лецитину) для визначення кількісного складу фосфоліпідів, фотометричне визначення розмірів ліпосом методом лазерного кореляційного розсіювання та методом атомносилової скануючої мікроскопії, жирнокислотного складу фосфоліпідів методом тандемної мас-спектроскопії, стабільності ліпосом методом електронного парамагнітного резонансу, біохімічні (спектрофотометричне визначення вмісту холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів і загального протеїну; імуноферментний аналіз концентрації для цитокінів IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, A β ₄₀, A β ₄₂); фізіологічні (введення амілоїдних пептидів A β (1-40) і A β (1-42), моделювання хвороби Альцгеймера); математичні методи експериментальних досліджень (симуляція молекулярної динаміки амілоїдних пептидів та протеїновий докінг одержаних моделей з куркуміном); застосування підходів нанотехнологій, поведінкові тести на лабораторних тваринах і методи варіаційної статистики за кількісної обробки результатів (пакет Statistica 8.0).

Наукова новизна отриманих результатів. Отримано експериментальні дані та результати комп'ютерного моделювання, які свідчать про низку нових аспектів у функціонуванні мономерів A β та їх складних комплексів (димерів, тримерів, гекса - і нонамерів), які дозволяють наблизитись до розуміння механізму утворення агрегатів A β в процесі розвитку хвороби Альцгеймера. Експериментально обґрунтовано новий підхід для подолання запальних процесів шляхом назального застосування ліпосомальної форми куркуміну. Вперше розроблено метод отримання суміші фосфоліпідів олії соняшника у вигляді порошку (знежирений сухий лецитин), та розроблена методика визначення якісного та кількісного складу фосфоліпідів суміші методом ВЕРХ, та визначено жирнокислотний склад лецитину. За допомогою спінових зондів вперше визначено стабільність ліпосом з фосфоліпідів соняшника, та показано їх істотну стабільність в умовах ініційованого окиснення в порівнянні з ліпосомами з фосфоліпідів сої та яєчного жовтка. Вперше створено ліпосомальну форму аденозинтрифосфат (АТР) для перорального застосування та ліпосомальну форму куркуміну з фосфоліпідів соняшника для назального застосування і визначено ефективність їх включення. Вперше показано, що для сольватованого гексамера A β , який складений з тримерів та молекул води, взаємодії між мономерами укладеної пари A β вносять більш суттєвий внесок у стабільність гексамера, ніж взаємодія мономерів тримера та з'ясовано, що заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg5, Asp7, Glu22, Asp23 та Lys28 в основному сприяють взаємодіям між парами мономерів і взаємодіям молекул води, що утворюють мережі водневих зв'язків між зарядженими залишками та підвищують стабільність сольватованого гексамера A β . Вперше показано зміну структури нонамера A β у воді, яка пояснює причину стабільності A β -нонамер та встановлено, що взаємодії між A β -пептидами складених пар сприяють, головним чином, стабільності A β -нонамера. Стабільність сольватованого A β -нонамера залежить від молекул води, що пов'язані з нонамером, а взаємодія між пептидами, складеними в A β -пари сильніші, ніж між пептидами тримера A β . Вперше встановлено, що куркумін може втручатися у процес утворення A β -мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесінгу A β PP. Вперше встановлено, що назальна терапія куркуміном у ліпосомальній формі для щурів з моделлю доклінічного етапу хвороби Альцгеймера

обумовлює пригнічення ангіотензин перетворювальної активності та виявила більший антицитокіновий потенціал у гіпокампі щурів, що призвело до відновлення показників пам'яті тварин. Вперше показано, що додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект $A\beta_{42}$ на моонуклеарний пул прозапальних цитокінів ($IL-1\beta$ і $TNF\alpha$), токсична дія $A\beta_{42}$ пригнічувала накопичення $IL-10$ в моонуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії мономерів амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. З'ясовано молекулярний механізм такої взаємодії та запропоновано використання куркуміну в ліпосомальній формі для пригнічення виникаючих запалень. Вагомість роботи полягає найперше у формулюванні гіпотези щодо зв'язування куркуміну з фрагментом протеїну попередника β -амілоїдних пептидів ($A\beta_{PP_63Rat}$), який вміщував всі три сайти ензимного процесінгу та втручання куркуміну у процес утворення $A\beta$ -мономерів. Практичне значення дослідження полягає в розробленні нових біотехнологічних підходів для вивчення специфіки взаємодії між β -амілоїдними пептидами в β -амілоїдних гексамерах та фібрилах, оцінки конформаційних змін β -амілоїдних мономерів в β -амілоїдних нонамерах, впливу іонів Zn на структуру β -амілоїдних наномерів, взаємодії між β -амілоїдними пептидами та похідними куркуміну. Дослідження впливу похідних куркуміну на розвиток хвороби Альцгеймера методом молекулярного моделювання дозволило наблизитись до розуміння терапевтичного ефекту куркуміну. Терапевтичні ефекти, продемонстровані на експериментальних тваринах, відкривають нові можливості для розробки іноваційних методів у боротьбі з запальними процесами нейродегенеративних захворювань, а назальну терапію куркуміном можна рекомендувати для створення та впровадження в лікувальну практику доклінічної стадії хвороби Альцгеймера антизапального спрею ліпосомальної форми куркуміну (Патент на корисну модель № 129295, 2018).

Проведено впровадження технології знежиреного лецитину соняшника і розроблених методик виділення, ідентифікації та кількісного визначення фосфоліпідів в промисловому виробництві ТОВ «НВФ БІОЛЕР», м. Дніпро (Акт впровадження від 08.02.2017 р.; Декларація про готовність до експлуатації об'єкта № ДП143160491104 від 18.02.2016 р.) та організовано промислове виробництво потужністю 30 т/міс. знежиреного лецитину соняшника «ТУ У 211.1.38873237-001.2013, Знежирений лецитин соняшника порошок» як харчового емульгатора та біологічно активної добавки; у проведенні навчальних та науково-дослідних робіт зі спеціальності «Фармакологія і фармація» в Дніпропетровській медичній академії (Акт впровадження № 1 від 07.06.2017 р., акт впровадження № 2/12-17 від 20.12.2017 р.); на фармацевтичному факультеті Запорізького державного медичного університету (Акт впровадження від 04.09.2017 р.). Розроблено і затверджено технічні умови «ТУ У 15.4-02128514-021: 2015, Фосфатіділхолін (L - α -лецитин) з фосфатидного концентрату соняшнику, 50%-й розчин». Розроблений іноваційний підхід із застосуванням нанотехнологій може бути використаний для цільової

доставки фармацевтично-активних сполук зі зменшенням їх потенційних побічних ефектів за використання у клінічній практиці.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено науковий пошук та критичний аналіз наявних даних літератури щодо обґрунтування ролі та вибраного таргетування ліпосомальної форми куркуміну у випадку хвороби Альцгеймера. В проведенні досліджень автором особисто виконано частину експериментальної роботи, аналіз отриманих результатів, їх наукову інтерпретацію та узагальнення, формулювання висновків та написання статей. Ряд експериментів було проведено разом зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками НВФ «Біолер» к.т.н. І.С. Глухом, к.х.н. А.І. Глухом. Дослідження гепатопротекторної дії та нейротропного ефекту знежиреного лецитину соняшника проведено у співпраці з співробітниками НДІ медико-біологічних проблем Дніпропетровської медичної академії (директор, д.м.н., проф. О.Л. Дроздов). Аналізування стабільності ліпосом проведено у співпраці із співробітниками Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України к.х.н. А.Л. Мельником, к.х.н. О.В. Суховеєвим, к.б.н. Л.В. Кононець. Моделювання хвороби Альцгеймера та оцінку ступеня впливу ліпосомальної форми куркуміну у експериментальних тварин на про- та антизапальні інтерлейкіни проводили разом із к.б.н., с.н.с. В.В. Соколик і д.м.н., проф. О.Г. Берченко на базі лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України». Автор щиро вдячний керівнику Департаменту комп'ютерних наук і інженерії Технологічного Університету міста Тойохаші (Японія) проф. Норіюкі Куріта та його співробітникам за плідну співпрацю з молекулярного моделювання утворення і взаємодії мономерів Аβ в різних модельних системах, впливу іонів Zn і куркуміну в агрегатах та можливість використання комп'ютерних потужностей.

Автор висловлює подяку науковому консультанту д.б.н., проф., академіку НАН України Я.Б.Блюму за допомогу у організації проведення досліджень, в обговоренні результатів та підготовці матеріалів до публікацій. Автор щиро вдячний академіку НАН України В.П. Кухарю за допомогу та постійну підтримку роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідались на щорічних конференціях Американського Товариства Хіміків Жирів (103 AOCS, 2012, Лонг Бич; 105 AOCS, 2014, Сан Антоніо, США; 104 AOCS 2013, Монреаль, Канада); X міжнародному конгресі з фосфоліпідів (10th ILPS, 2011, Роттердам, Нідерланди); VI та VII Міжнародному конгресі «Біотехнологія: стан і перспективи розвитку» (2011, 2013, Москва, РФ); Міжнародних конференціях (2003, 2013, Дніпропетровськ, 2012, Одеса), Міжнародній конференції «Химия, Био- и Нанотехнологии» (2013, Щолкіно, АР Крим), 15 Європейському конгресі з біотехнології (2012, Стамбул, Туреччина); 11 Конгресі Європейської федерації ліпідів (2012, Стамбул, Туреччина); V Міжнародному симпозиумі МАСС-5 (2013, Харків); XXIII Українській конференції з органічної хімії, присвяченої 95-річчю заснування НАН України (2013, Чернівці); XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів (2015, Львів); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики, комп'ютерного моделювання та обчислювальної техніки» (2016, Пенанг, Малайзія); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики: концепції, теорія та застосування (ІСАІСТА2017)» (2017, Кута, Індонезія), слухали та обговорювали на засіданнях

відділу промислової та харчової біотехнології (пізніше відділу геноміки та молекулярної біотехнології) Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

Публікації. Результати дисертації викладено у 27 статтях, зокрема, у 10 статтях опублікованих у виданнях першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, 2 монографіях і 7 патентах та 17 тезах конференцій і з'їздів.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дисертацією є сукупність наукових статей з детальним аналізом сучасного стану наукової проблеми та запропонованого рішення щодо її експериментального вирішення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі експерименти проводили на лабораторних тваринах із дотриманням міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях», та статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447- IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятих в установах НАН України та НАМН України. Протоколи дослідів було погоджено Комісією з біоетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Комісією з біоетики ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України». В експериментах використовували щурів ліній Вістар (Wistar), яких утримували за стандартних умов.

Визначення впливу перорального введення ліпосомної форми АТР на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження. Дослідні тварини (60 білих лінійних мишей-самців з масою тіла 22–28 г) перебували у віварії на стандартному раціоні віварію і отримували питну воду та корм *ad libitum*. Методом випадкової вибірки тварини було розподілено на 6 груп по 10 особин: перша – інтактна група тварин, яких утримували за стандартних умов віварію (контроль); друга – група тварин, яким перорально вводили порожні ліпосоми; третя – група тварин, яким перорально вводили АТР з розрахунку 30 мг/кг; четверта – група тварин, яким перорально вводили АТР з розрахунку 60 мг/кг; п'ята – група тварин, яким перорально вводили ліпосомальну форму АТР з розрахунку 30 мг/кг; шоста – група тварин, яким перорально вводили ліпосомальну форму АТР з розрахунку 60 мг/кг. Порожні ліпосоми, ліпосомальну форму АТР і АТР у вільному вигляді вводили за 5 хв до початку експерименту.

Експериментальні моделі хвороби Альцгеймера створювали на загальній вибірці (149 тварин) щурів-самців статевозрілого віку (5-6 міс.) вагою 280-350 г віварію ДУ ІНПН НАМН України. Тварини перебували при контрольованому 12-годинному циклі світло-темрява, стандартному кормі для щурів і водопровідній воді. У дослідженні було задіяно дві експериментальні моделі хвороби Альцгеймера (AD) на щурах у залежності від типу впливу: ін'єкційні моделі доклінічного етапу

патології (введення A β 40: Amyloid β Protein Fragment 1-40 (Sigma-Aldrich, USA) до ланки неокортексу головного мозку або A β 42: Amyloid β Protein Fragment 1-40 (Sigma-Aldrich, USA) інтрагіпокампально щурам у дозі 15 нМ) та коагуляційна модель клінічної стадії AD (шляхом електролітичної деструкції ділянки неокортексу головного мозку тварин протягом 10-15 с струмом силою 1-5 мА). Концентрацію цитокінів у супернатантах суспензії моноклеарів визначали імуноферментним методом (ІФА) у трьох повтореннях, відповідно до протоколу наборів «Вектор-Бест», Росія для IL-1 β , IL-6, IL-10 і TNF α , а також A β 40 набором ELISA Kit Human A β 40, Invitrogen Corporation. Оптичну густину зчитували мікропланшетним аналізатором GBG Stat FAX 2100, США (довжина хвилі 450 нм) з корекцією довжини хвилі при 630 нм.

Для вимірювання необхідних показників застосовували набори реагентів холестерол «СпайнЛаб» або «Реагент» (Україна); тригліцериди «СпайнЛаб» (Україна) або «Сормау» (Польща); PHOSPHOLIPIDS «Sentinel Diagnostics» (Italy); «Холестерин ЛВП» фірми «Ольвекс Диагностикум» (РФ); PROTEIN TOTAL Liquicolor (HUMAN); ИЛ-1бета-ИФА-БЕСТ, ИЛ-6-ИФА-БЕСТ, ИЛ-10-ИФА-БЕСТ і альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ «Вектор-БЕСТ» (РФ); Rat ELISA Kits, Invitrogen BCM DIAGNOSTICS (США) для IL-1 β , IL-6, IL-10 і TNF α ; 3-CAT ELISA (ФРН); A β 40 і A β 42 ELISA Kit «Invitrogen BCM DIAGNOSTICS» (США); Endothelin 1 «Cloud-Clone Corp». (США); NSE-ИФА-БЕСТ «Вектор-БЕСТ» (РФ), Human NOS endothelial ELISA Kit «EIAab» (Китай); CanAgS100 EIA «FUJIREBIO» (Швеція); ГГТ «Філісіт-Діагностика» або «Реагент» (Україна); ACE colometric kit «BUHLMANN» (Швейцарія).

Виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату олії соняшника проводили екстракцією ацетоном. Спочатку 100 г фосфатидного концентрату соняшника марки СХ-1 виробництва Запорізького МЖК з наступними характеристиками: масова частка фосфатидів – 65,2%; масова частка олії – 32,8%; масова частка вологи та летких речовин – 0,8%; масова частка речовин, нерозчинних в етиловому етері – 1,2%; кислотне число олії – 8 мг КОН / г; перекисне число – 10 ммоль $\frac{1}{2}$ О/кг. підігрітого до T=67°C, фільтрували крізь фільтрувальну тканину Бельтінг (артикул 2030 за ГОСТ 332) на воронці Бюхнера. До відфільтрованого фосфатидного концентрату додавали 400 г (506 мл) ацетону (ацетон марки ХЧ 99,9%), суміш нагрівали до T=45°C та інтенсивно перемішували протягом 5 хв. Суспензію охолоджували до кімнатної температури і вводили у центрифугу з фактором розділення 100. Осад висушували за T=30-35°C, під вакуумом, потім просіювали через сито, з діаметром отворів 1мм, і одержували 56,74 г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Визначення макрокомпонентного та жирнокислотного складу лецитину проводили за використання ВЕРХ. В роботі використовували вискоєфективний рідинний хроматограф «Dionex Ultimate 3000» (Dionex, ФРН), до складу якого входять: насос LPG-3400A; детектор спектрофотометричний VWD-3400. Для хроматографічного розділення фосфоліпідів на колонці Ultra II Silica, 3 мкм, 100 \times 4,6 мм, яка дає змогу визначити кількісний вміст основних компонентів лецитину соняшника, використовували як елюент суміш ацетонітрилу, метанолу, концентрованої ортофосфатної кислоти і води. Було встановлено, що оптимальним

для розділення був такий склад рухомої фази: А:В = 99,6 : 0,4; де А – CH_3CN : CH_3OH : H_3PO_4 = 490 : 5 : 5, В – H_2O . Пробу попередньо фільтрували через політетрафторетиленовий (ПТФЕ) фільтр у вигляді шприцевої насадки з діаметром пор 0,22 мкм. Після кожного аналізу колонку промивали протягом 10–15 хв зі швидкістю 1 $\text{cm}^3/\text{хв}$.

Препаративне виділення фосфатидилхоліну (РС) проводили препаративною хроматографією за допомогою основного оксиду алюмінію. Фосфоліпіди розчиняли в суміші метанол–хлороформ (1:1) і вносили в колонку. РС з домішкою лізофосфатидилхоліна (LPC). Промивали двома повними об'ємами колонки. 75% першого об'єму відкидали. Після виходу РС колонку промивали одним об'ємом тієї самої суміші. Фосфатидилетаноламін (PE) з домішкою фосфатидилсерину (PS) вимивали 2–3 об'ємами суміші етанол–хлороформ–вода (5:2:2). Перший об'єм відкидали. Обидва елюати випаровували (досуха) на роторному випарнику. Вихід становив 80–90% від теоретично можливого.

Реактиви та розчинники. Вода деіонізована, отримана за допомогою системи очищення води – Direct-Q, Millipore; хлороформ, HPLC grade, Merck; метанол, HPLC grade, Merck; ортофосфатна кислота, HPLC grade, Merck; ацетонітрил, HPLC grade, Merck; гексан, HPLC grade, Merck; бензол, HPLC grade; стандарт фосфоліпідів (Phospholipid Mixture for HPLC from Soybean, Supelco, P3817-1VL, varied conc. in chloroform, L- α -PC 1500 $\mu\text{g}/\text{мл}$, L- α -PE 1200 $\mu\text{g}/\text{см}^3$, L- α -PI (у вигляді солі амонію), 900 $\mu\text{g}/\text{см}^3$, L- α -LPC 300 $\mu\text{g}/\text{см}^3$); етанол фарм.; TLC Silica gel 60, Merck, чда; Aluminium oxide for chromatography, basic. Brockmann I, 50–200 μm , Acros Organics; тетрахлорметан, ч. д. а., ГОСТ 20288-74, АТ «Реахим» (Росія); фосфатидний концентрат соняшника виробництва Запорізького МЖК з наступними характеристиками: масова частка фосфатидів – 65,2%, масова частка олії – 32,8%, масова частка води та летких речовин – 0,8%, масова частка речовин, не розчинних в етиловому етері – 1,2%, кислотне число олії, виділеної з концентрату – 8 мг КОН/г, пероксидне число – 10 ммоль $\frac{1}{2}$ O/kg; лецитин соняшника знежирений харчовий (SFL), ТОВ «НВФ БІОЛЕР» (м. Дніпро); лецитин сої знежирений харчовий (SL, SOLEC), SOLAE LLC (США), ваги – Radwag, XAS 220/С.

Ідентифікацію фосфоліпідів проводили методом тандемної мас-спектрометрії. Ідентифікацію груп фосфоліпідів здійснювали за наявністю відповідних молекулярних іонів речовин, а жирнокислотний склад і характерні структурні фрагменти (залишки інозиту, гліцеролу тощо) підтверджували за вмістом характерних дочірніх іонів-уламків у спектрі фрагментації батьківських іонів. Групу фосфатидилхолінів ідентифікували в режимі позитивної іонізації скануванням іонів-попередників дочірнього іона відношенням маса/заряд 184 (залишок РС).

Методи приготування ліпосом обирали в залежності від складу лецитинів, які використовували (соняшника, сої, яєчного жовтка) і властивостей фармацевтично активного інгредієнта. Ліпосоми готували методами «заморожування – танення»; «сонікації», використовуючи ультразвуковий гомогенізатор (Techpan UD-20) із частотою $22 \pm 0,165$ кГц та екструзії за допомогою ручного екструдера «LiposoFast-Basic», AVESTIN (США).

Виготовлення ліпосомальної форми АТР здійснювали модифікованим методом

«заморожування – танення» як найбільш ефективного для включення АТР у ліпосоми. Для отримання ліпосом брали сухий знежирений лецитин (суміш фосфоліпідів) соняшника ТОВ «НВФ БІОЛЕР»Україна; холестерол (AppliChem GmbH, Німеччина) і поліетиленгліколь (A.C.E.F. S.p.A., Італія) у масовому співвідношенні 2,45:1:0,04. Підготовлену суміш розчиняли в органічному розчиннику та випарювали в ротаційному випарювачі до утворення ліпідної плівки. Процес гідролізу ліпідної плівки проводили за температури 40°C розчином АТР (Sigma, США) за концентрації 20 ммоль/л протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів «заморожування – танення». Заморожування проводили за температури – 80°C, танення – на водяній бані за T=+30°C. Розчин АТР, що не потрапив у ліпосоми, відділяли центрифугуванням. *Виготовлення ліпосом методом сонікації* використовували для визначення за допомогою спінових зондів стабільності ліпосом утворених з різної сировини. З метою повного переведення сухого лецитину в розчинений стан наважку 80 мг розчиняли в перегнаному хлороформі, загальний об'єм складав 5 мл. Випарювання проводили на роторному випарювачі за температури 50°C. Після чого в колбу додавали 5 мл 0,1 М трис-НСІ, рН 7,4, інтенсивно змиваючи отриману плівку. Плівка, отримана в результаті випарювання лецитину яєчного жовтка і соняшника, змивається приблизно однаково і, в середньому, за 10 хв повністю розчиняється. Утворена плівка із лецитину сої змивається погано і протягом 30 хв інтенсивного змивання залишаються певні нерозчинні компоненти, які міцно тримаються на стінці колби. Далі розчин піддавали соніфікації на льодовій бані протягом 15 хв під впливом ультразвукового дезінтегратора Teshpan UD-11 (Польща) з частотою 22±0,165 кГц і центрифугували..

Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшника, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину куркуміну, випарювання суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію і екструзію через мембрани. Суміш фосфоліпідів знежиреного лецитину соняшника (SFL) НВП Біолер (Україна), холестеролу Sigma-Aldrich, (США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену у співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, розчиняли, додавали водно-етанольний розчин куркуміну (куркумін I (curcumin), диметоксикуркумін (demethoxycurcumin) – куркумін II та бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin) – куркумін III) у вигляді суміші: 77% куркуміну I, 18% куркуміну II і решта – куркуміну III (Sigma-Aldrich, США) у співвідношенні куркумін : ліпіди 1 : (10-15). Суміш випарювали в потоці газу азоту (N₂) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі RE 301 (Китай) до утворення сухої плівки, потім гідратували додаванням необхідної кількості деіонізованої води. Для однорідності розчин проводили через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснювали послідовну екструзію за допомогою ручного екструдера «LiposoFast-Basic», AVESTIN (США) через мембрани з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Розмір «порожніх» ліпосом та ліпосом з куркуміномі АТР визначали за допомогою: а) *динамічного світлорозсіювання*, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Великобританія). Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної суспензії ліпосомальної форми, здійснювали за температури

25°C під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Результати розподілу за розмірами в одиницях інтенсивності та кількісному вимірі одержали з аналізу кореляційної функції з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення Zetasizer Software 6.20. б) *атомно-силової мікроскопії (AFM)*. Як зонд використовували кантилевер (мікроскопічна «балка» з голкою на кінці). У роботі використаний атомно-силовий мікроскоп N'Tegra Aura (фірми НТ-МДТ, Росія) з вбудованими ємкісними датчиками для компенсації нелінійності сканера і кремнієві кантилевери NSC15 (MikroMash, Естонія). Вимірювання проводили в напівконтактному режимі сканування за постійної амплітуди коливань в режимі відштовхування. Зображення рельєфу (Height) і зображення сигналу помилки неузгодженості (mag) отримували за допомогою програми Gwyddion, що входить в пакет вільного і відкритого програмного забезпечення.

Стабільність ліпосом досліджували методом електронно-парамагнітного резонансу (EPR). Як спінові зонди було використано стабільні нітроксильні радикали 1-окси-2,2,6,6-тетраметилпіперидин-4-іл-5,7-діметиладамантан 1-карбонової кислоти (DMAC-TEMPO), синтезовані в Інституті біоорганічної та нафтохімії НАН України; 5-доксилстеаринової кислоти (5-DSA) і 16-доксилстеаринової кислота (16-DSA), Sigma-Aldrich; як ініціатор перекисного окислення ліпідів був використаний 2,2' азобіс (2-метилпропіонамідін) дигідрохлориду (ABAP), Sigma-Aldrich; ЕПР-спектри реєстрували на X-діапазоні спектрометра Bruker ELEXSYS E580 X-діапазон (9 ГГц), Bruker (США). Параметри експерименту були наступними: частота і потужність мікрохвиль – 9,863 ГГц і 1 mW (лінійна ділянка кривої насичення), відповідно, частота модуляції – 100 кГц, амплітуда модуляції – 1 G, діапазон сканування – 100 G, постійна часу – 81 мс, час розгортки – 90 с, кількість сканувань – 4. Температура під час запису одного спектра $295 \pm 0,5$ K. Термостатування проводили за допомогою приставки BVT 3000. Для кожного значення температури було встановлено час стабілізації 3 хв. Похибка вимірювань становила $\pm 0,3$ K. Кінетичні дослідження EPR були проведені в X-діапазоні ЕПР-спектрометра Varian E-3 (США). Параметри експерименту були наступні: частота і потужність – 9,11 ГГц і 0,63 mW, частота модуляції – 100 кГц, амплітуда модуляції – 2 G; діапазон сканування – 50 G з центральним значенням магнітного поля 3205 G, постійна часу – 1 с, час сканування – 4 хв.

Методами імітаційного компютерного моделювання вдається отримати важливу інформацію стосовно властивостей молекулярних систем, при цьому ступінь її детальності інколи навряд чи можна досягнути в реальному експерименті. В дослідженні *in silico* були задіяні програми GROMACS 4.5, GROMOS 43a2 force field; AMBER12, AMBER99SB TIP3P; ABINIT-MP Ver.6.0; ab initio MP2/6-31G;

Для *обробки та статистичного аналізу* експериментальних даних застосовували методи варіаційної статистики та відповідні статистичні тести. Для нормально розподілених вибірок експериментальних даних (згідно тесту Шапіро-Уїлка) визначали середні значення та похибку середнього і застосовували параметричні тести (*t*-тест Стюдента, ANOVA). Вибірки даних, що не відповідали критерію нормального розподілу, представляли як значення медіан та застосовували непараметричні тести (Манна-Уїтні, Колмогорова-Смірнова). Критерієм

достовірності міжгрупових відмінностей вважали різницю при вірогідності $P < 0,05$.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Існування фосфоліпідів в «сирій» нерафінованій олії в кількості 0,6-1,2% призводить до утворення значної кількості фузистої олії (бакових відстоїв), а її рафінація призводить до значних втрат олії з гідратаційним осадом. Економічно доцільним рішенням цієї проблеми є гідратація олій з подальшим отриманням фосфатидного концентрату. Олійно-жирова промисловість випускає фосфатидні концентрати марок СХ 1, СХ 2, СХ 3, СК з різним вмістом фосфатидів (масова частка може складати не менше 60 – 40%), і олії (масова частка може складати не більше 40 – 60%). З метою визначення можливості використання фосфатидного концентрату будь-якої марки розроблено універсальну технологію виділення фосфоліпідів тристадійною обробкою фосфатидного концентрату олії соняшника ацетоном і фільтрацією після кожної стадії. Для підвищення продуктивності кожний етап фільтрації проводили за допомогою центрифуг з факторами розділення 1) ≤ 100 , 2) ≤ 150 , 3) ≤ 200 , впродовж 60-65, 40-45 і 30-35 хв, на першій, другій і третій стадіях, відповідно. Основні характеристики SFL наведено на рис. 1

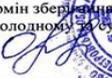
Макрокомпонентний склад сухого знежиреного лецитину визначено в порівнянні з результатами дослідження ВЕРХ стандартної (відомий склад і концентрація компонентів) суміші фосфоліпідів сої.

 «БІОЛЕР» ТОВ Науково-Виробниче Підприємство		
ХАРЧОВІ, КОРМОВІ, ФАРМ. ФОСФОЛІПІДИ, ТЕХНОЛОГІЯ ФОСФОЛІПІДІВ З РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ Знежирений лецитин з соняшника порошкоподібний ТУУ 21.1-38873237-001:2013		
Партия № 15102012	Дата виробництва: грудень / 2020 р.	
Найменування показників згідно ТУУ 21.1-38873237-001:2013	Характеристика та норма	Результати
Зовнішній вигляд	Сипуча порошкоподібна маса без сторонніх включень. Без смаку та запаху. Допускається ледь помітний специфічний присмак і запах соняшникової олії. Не допускається затхлий, кислий чи інші сторонні смак і запах.	відповідає
Запах та смак	Від жовтувато-сірого до жовтувато-коричневого.	відповідає
Колір		відповідає
Масова частка вологи, %, не більше	1,4	0,3
Масова частка олії, %, не більше	1,5	0,7
Перекисне число, ммоль/кг $\frac{1}{2}O_2$, не більше	10,0	2,1
Кислотне число, мг КОН/г, не більше	32,0	16,0
Масова частка речовин, нерозчинних у толуолі, %, не більше	2,0	0,1
Масова частка фосфоліпідів, %, не менше	95,1	98,9
п-натрон-метил, мг/кг	не допускається	
Залишковий вміст ацетону, мг/кг	< 50	5,0

* - нижче чутливості методу

Продукт відповідає вимогам ТУУ 21.1-38873237-001:2013.

Гарантійний термін зберігання в оригінальній упаковці у прохолодному місці - 24 місяці від дати виробництва за умови зберігання в оригінальній упаковці.

Директор  О.В.Тимшенко



ag@biolerlecithin.com
 iggl@biolerlecithin.com
 gsg@biolerlecithin.com
 tov@biolerlecithin.com
 skype: tov007

вул. Степова, 1а, с. Новоолександрівка
 Дніпропетровська область, 52070, Україна
Поштова адреса: а/с 2263, Дніпропетровськ, 49038
 Тел./ФАКС: + 38 056 767 61 63
 ІК: 38873237

Рис 1. Характеристики знежиреного лецитину соняшника.

Серед основних макрокомпонентів SFL визначено (рис. 2) фосфатидилхолін; фосфатидилетаноламін; фосфатидилінозитол (PI); фосфатидна кислота, phosphatidic acid (PA); хлорагенова кислота, chlorogenic acid (ChA); α -токоферол (α ToC). На рис.

3 приведено хроматограму РС віділеного екстракцією EtOH та очищеного за допомогою оксиду алюмінію. Кількісний склад фосфоліпідів наведено в табл. 1.

Властивості і застосування сухого знежиреного лецитину. Лецитин з рослинної сировини належить до природних харчових добавок (E 322) і для нього відсутні обмеження на застосування в харчовій промисловості, а за своїми технологічними функціями – до емульгаторів і антиоксидантів. Лецитин – ефективний поверхнево-активний агент для поверхонь розділу фаз різних субстанцій. *SFL як емульгатор в продуктах харчування і кормах* з урахуванням технологічності його застосування рекомендовано для промислового використання. SFL у кількості 0,4% від маси борошна в тісті покращував органолептичні (збільшення пористості) та фізико-хімічні показники хлібобулочних виробів (збільшення об'ємного виходу, збереження вологи), створював стабільні маргаринові емульсії (у з'єднанні з емульгаторами, що використовуються у виробництві маргаринів) з кількістю жиру 82, 72, 60 і 50%, а також маргаринів для листкового тіста. При цьому кількість SFL, яка потрібна для створення стійкої

емульсії, в два рази менше (0,05%), ніж за використання лецитину сої (SL) (0,125%), а для стабільних емульсій майонезу зменшення кількості жиру досягає 1,5–2 рази.

Рис. 2. Хроматограма сухого знежиреного лецитину соняшника. Умови хроматографування: $v=1$ мл/хв, $t=20^\circ\text{C}$, $\lambda=208$ нм, колонка: Ultra II Silica, 3 мкм, $100\times 4,6$ мм рухома фаза: ізократичний режим, А:В=99:1; А- $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4=490:5:5$ (об.%), В – H_2O . Часи утримування: 2,707хв – РІ; 6,873хв – РЕ; 10,133 хв – РС.

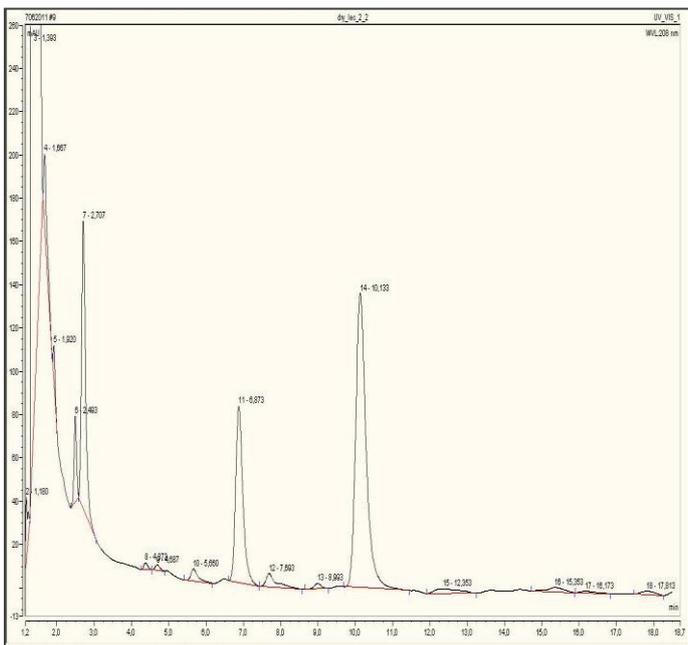
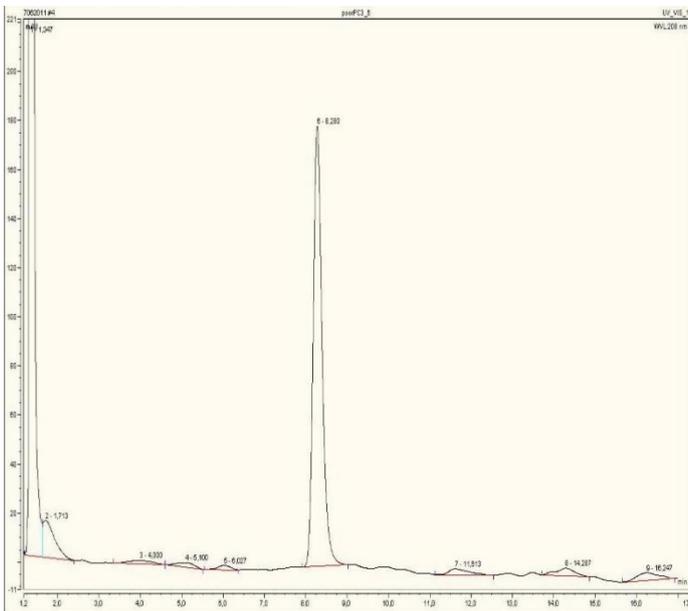


Рис. 3. Хроматограма РС, виділеного з лецитину соняшника методом колонкової хроматографії на основному оксиді алюмінію. Умови хроматографування: $v=1$ см³/хв, $t=20^\circ\text{C}$, $\lambda=208$ нм, колонка: Ultra II Silica, 3 мкм, $100\times 4,6$ мм рухома фаза: ізократичний режим, А:В=99:1; А - $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4=490:5:5$ (об.%), В – H_2O . Час утримування РС – 9,480 хв.

Вміст фосфоліпідів в різних зразках

Зразок	Фосфоліпід	Вміст, мас. %
SFL	PC	29,4 ± 0,3
	PE	12,5 ± 0,4
	PI	19,2 ± 0,5
Екстракт етанолом	PC	63,7 ± 0,1
	PE	6,7 ± 0,2
	PI	1,4 ± 0,2
Екстракт ізопропанолом	PC	48,5 ± 0,3
	PE	4,4 ± 0,1
	PI	2,2 ± 0,1
PC, очищений препаративною хроматографією	PC	97,8 ± 0,8

SFL як сировина для транспортних наносистем. Ліпосомальні препарати фосфоліпідної природи почали активно застосовувати у медичній практиці, тому для даного нового класу лікарських речовин актуальним є питання сировинних джерел і методів одержання фосфоліпідів. SFL з рослинної сировини, який містить фосфоліпідів (кількісний склад яких можна змінювати, зокрема для PC від 30 до 98%) притаманні мембранам стінок клітин і який отримують в промислових масштабах, слугує відносно дешевою сировиною для виробництва ліпосом. Ліпосоми отримані з природних фосфоліпідів, в порівнянні з полімерними системами доставки, повністю біодеградують, біосумісні, їх введення не пов'язане з ризиком розвитку токсичних ефектів, імуногенності і алергічних реакцій. Крім того, однією з позитивних властивостей таких ліпосом, як транспортної системи, є фармакологічна активність самих природних фосфоліпідів.

Методи отримання одношарових і багатошарових ліпосом. Широкому застосуванню ліпосом перешкоджають зміни фізико-хімічних властивостей мембран ліпосом в залежності від фосфоліпідного складу та впливу зовнішніх факторів. Тому одним з актуальних завдань є вибір оптимальної сировини для приготування ліпосом і спосіб їх отримання. Основними характеристиками ліпосом є розмір та об'єм внутрішнього водного простору (мл/г ліпиду). Визначити метод отримання ліпосомальної форми для певного фармацевтично активного інгредієнта можна реально тільки експериментальним шляхом і з наступною перевіркою отриманих результатів за допомогою електронно сканувальної або атомно силової мікроскопії. Для створення ліпосомальної форми АТР найкращий метод заморожування – танення (отримано великі одношарові везикули - LUV), а для ліпосомальної форми куркуміна – екструзію через мембрани (отримано малі одношарові везикули - SUV).

Визначення жирнокислотного складу ліпосом.

Ідентифікацію фосфоліпідів та їх жирнокислотний склад проводили методом

тандемної мас-спектрометрії. Використовували електрохімічне розпилення в позитивному (ідентифікація фосфатидилхолінів) та негативному (інших фосфоліпідів) режимах. Результати аналізу фосфоліпідного складу методом тандемної мас-спектрометрії в режимі негативної йонізації представлено на рис. 4а. За допомогою даного спектру за масами молекулярних йонів було ідентифіковано PI, PE, PA і фосфогліцерол (PG) та їх відповідні лізоформи. На рис. 4б представлено спектр мас йонів в позитивній йонізації. PC, якого не видно в негативній йонізації, тут чітко видно. Маса його основних молекулярних йонів складала 782,7 та 784,7. Молекулярна маса залишку холіну складала 520,4, що підтверджує, що це саме форми фосфатидилхоліну (табл. 2).

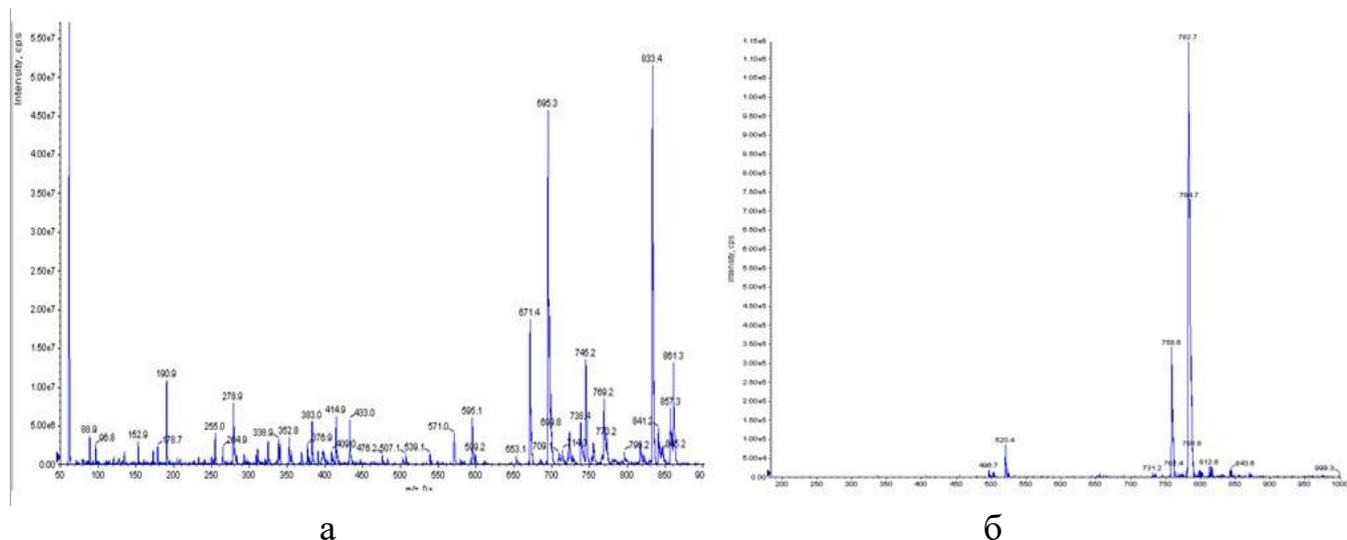


Рис. 4. Мас-спектрометрія іонів лецитину соняшника від 50 до 1 000 о.е.м./заряд: **а)** негативна йонізація, **б)** позитивна йонізація.

Основними насиченими жирними кислотами лецитину є пальмітинова кислота (16:0) і стеаринова кислота (18:0), а ненасиченою – лінолева кислота (18:2, омега-6). Пальмітинова та лінолева жирні кислоти по-різному рекомбіновані в складі молекул фосфоліпідів соняшника.

Визначення стабільності ліпосом методом ЕПР, який використовували для дослідження впливу температури на стабільність ліпосом. Як спінові зонди застосовували нітроксильні радикали - біс(1-оксил-2,2,6,6-тетраметил піперидин- іл-4-овий) естер 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислоти (рис. 5а) і комерційний препарат 16 -доксилстеаринової кислоти - 2-(14-карбоксі тетра- децил)-2-етил-4,4-диметил-3-оксазоліндоксил (рис. 5б) (Aldrich).

Для приготування ліпосом використовували лецитини яєчного жовтка (Fluka), соняшника і сої. Ліпосоми готували методом ультразвукової соніфікації. Розраховані значення τ_{eff} представлені на рис. 6.

Для ліпосом із насіння соняшника значення часу кореляції обертальної дифузії є найбільшими на всьому температурному діапазоні, це відповідає найбільш «ускладненому» обертанню зонда, розчиненого в мембрані, що свідчить про найбільшу жорсткість даних ліпосом і є додатковим підтвердженням їх більшої стабільності. Для вивчення *властивостей ліпосом щодо ініційованого окислення* використовували систему, яка вмшувала суспензію ліпосом (приготовлену

аналогічно попереднім) і азоініціатор 2,2'-азобіс (2-метилпропіонамідін) дигідрохлорид, реакцію проводили за $T=45^{\circ}\text{C}$. Стабільність ліпосом різного походження до ініційованого окислення зображено на рис. 7. Найбільшою стійкістю характеризуються ліпосоми, отримані з фосфоліпідів соняшника, оскільки інтенсивність сигналу ЕПР протягом часу експерименту не знижується, що може свідчити про наявність природних антиоксидантів, що запобігають процесам окислення. Такими антиоксидантами є хлорогенова кислота та токоферол. Для ліпосом отриманих із яєчного жовтка і сої сигнал ЕПР має тенденцію до зниження. Отримані результати вказують на взаємодію нітросильного радикалу з продуктами перекисного окиснення ліпідів.

Таблиця 2

Ідентифікація компонентів лецитину соняшника

Фосфоліпід	Маса іонів (а.о.м.)	Залишки жирних кислот
PI	833	16:0, 18:2
	857	18:2, 18:2
	861	18:0, 18:2
LPI	595	18:2
	571	16:0
PA	695	18:2, 18:2
	671	16:0, 18:2
	699	18:0, 18:2
PE	738	16:0, 18:2
PG	769	16:0, 18:2
	721	16:0, 16:0
	745	16:0, 18:2
LPG	483	16:0
PC	782	18:2, 18:2
	758	16:0, 18:2
LPC	520	18:2
	496	16:0

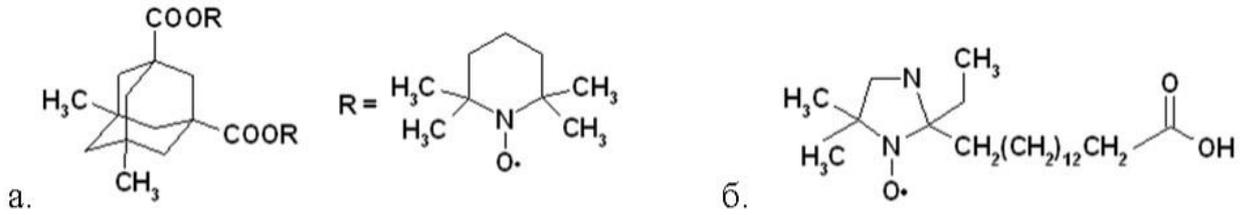


Рис.5. Структурні формули спінових зондів: а) на основі адамантану, б) 16-DSA.

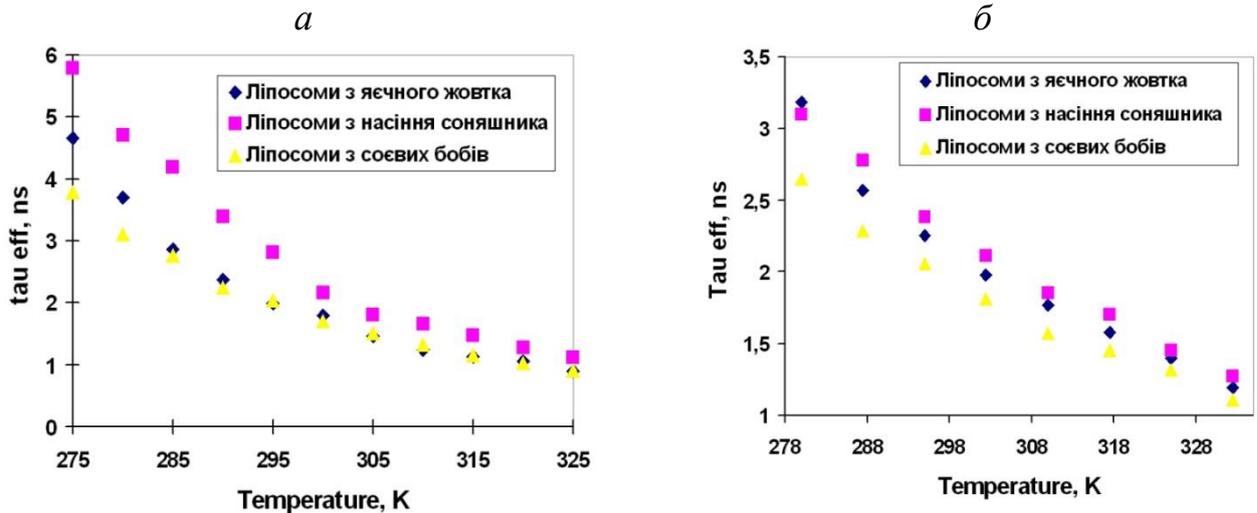


Рис. 6. Температурні залежності часу кореляції обертальної дифузії нітроксильних радикалів в ліпосомах, утворених фосфоліпідами із різної сировини: а) для бірадикалу на платформі адамантану, б) для 16-доксилстеаринової кислоти.

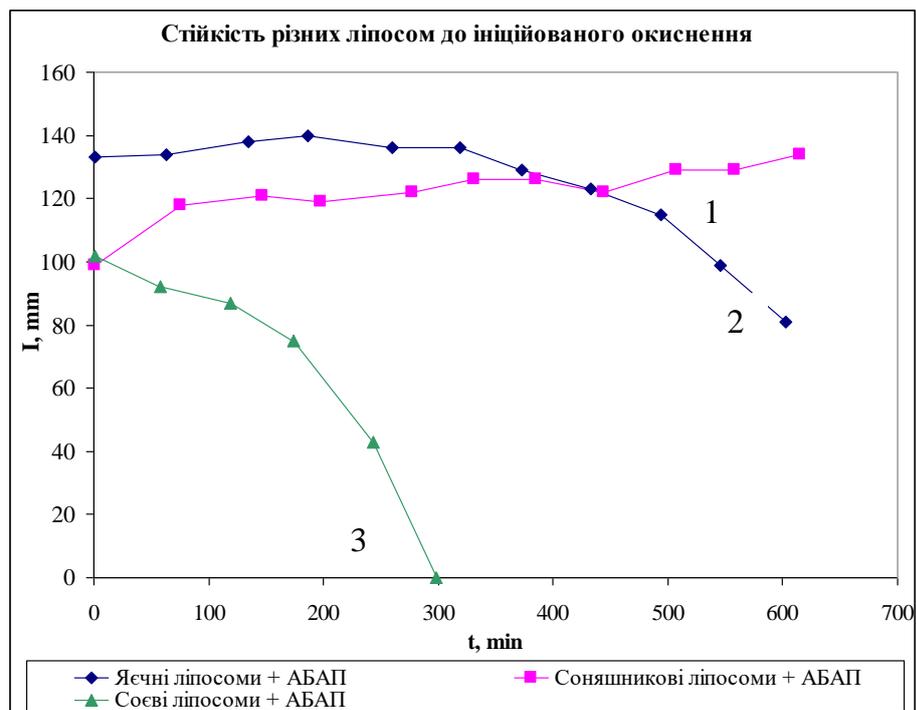


Рис. 7. Інтенсивність сигналу інкапсульованого бірадикалу в ліпосоми при ініційованому окисненні: 1- соняшник; 2- жовток яєць; 3- соя.

Моделювання стабільності ліпосом («крупнозерниста» модель) для з'ясування деформації форми різних видів ліпосом. Досліджували два типи моделей: (i) моделі з однаковим числом (SNL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів, розташованих на внутрішньому і зовнішньому шарах мембрани ліпосом і (ii) модель з однаковою щільністю (SDL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів у внутрішньому та зовнішньому шарах ліпосоми. Ліпосоми в процесі експериментів реально мали коливання щільності в межах між SNL та SDL. Щільність РНО на внутрішній поверхні приймалась за початкову умову. У ліпосомах SDL типу, внутрішній і зовнішній шари ліпосом були незалежно побудовані з одиничних правильно орієнтованих молекул фосфоліпідів. Для моделювання обрали наступні фосфоліпіди: dipalmitoyl-phosphatidyl-choline, (DPPC); dimyristoylglycerophosphatidyl-choline, (DMPC); palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-choline, (POPC); palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-ethanolamine (POPE) (рис. 8).

Мономери фосфоліпідів було рівномірно розташовано на обох поверхнях таким чином, щоб щільність фосфоліпідів в обох шарах була однакова, а «хвости» жирних кислот було направлено на зустріч один одному. У невеликих за розміром ліпосомах, ділянки внутрішньої та зовнішньої поверхні суттєво інші. Внутрішню порожнину ліпосоми заповнювали молекулами води, які мали таку ж щільність що і назовні і мали початкову структуру сольватованої ліпосоми. Для чотирьох типів SNL, кожен з яких складався з 3278 ліпідів, було встановлено діаметр і товщина мембрани – 25 і 4,5 нм, відповідно. Порівняно з SNL, зовнішній шар SDL заповнений більшою кількістю ліпідів і тому він більш щільно вкритий полярними групами.

Моделювання з використанням молекулярної динаміки (MD) показало, що: (1) SNL зберігали сферичну форму навіть за 360 К, що свідчило про їх більшу стійкість до теплових коливань в порівнянні з SDL (рис. 9), (2) SNL, що складались з DMPC, мали сферичну форму, мінімальний діаметр, навіть за 360 К. (3) SDL мали практично ідеальну геометричну форму, оскільки їх зовнішня поверхня рівномірно заповнена полярними групами ліпідів за 310 К (рис. 10). Однак, за 360 К у SDL відбуваються значні деформаційні зміни сферичної форми.

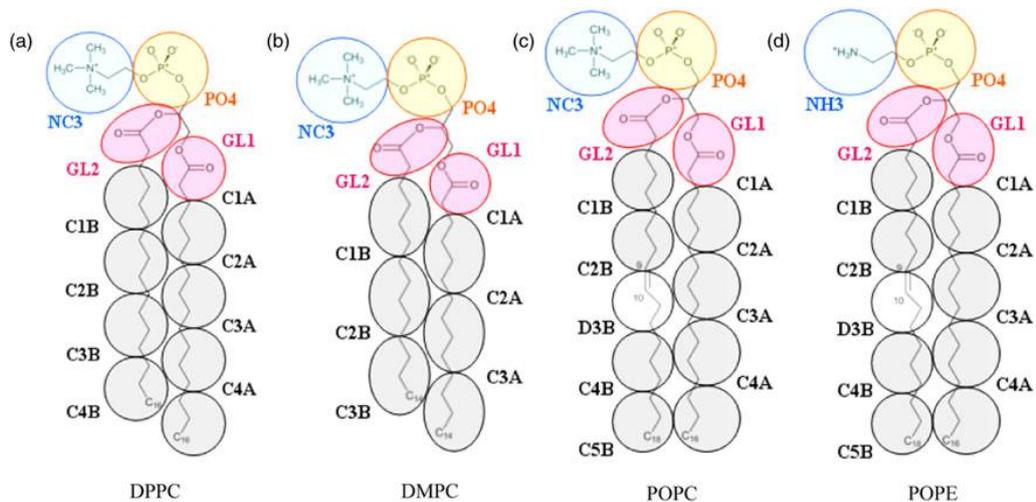


Рис. 8. Модель крупнозернистої структури фосфоліпідів.

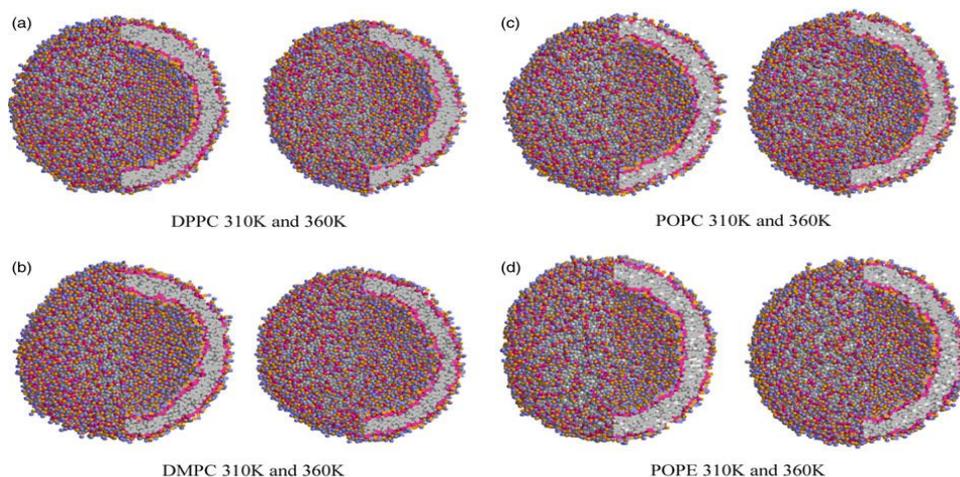


Рис. 9. Структури SNL, отримані методом молекулярної динаміки за 310 і 360 К: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC і (d) POPE.

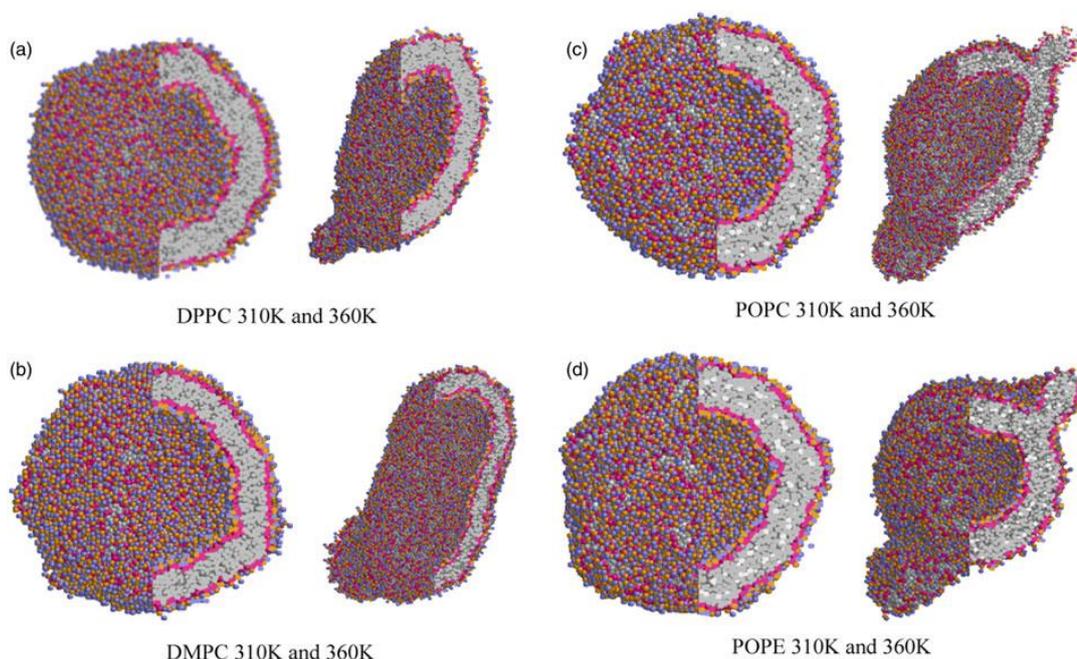


Рис. 10. Структури SDL отримані методом молекулярної динаміки за 310 і 360 К: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC і (d) POPE.

Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. За активації м'язової діяльності гідроліз АТФ пришвидшується й інтенсивність енергетичного обміну зростає в сотні разів порівняно зі станом спокою. Як спосіб захисту АТФ від руйнування за перорального застосування було досліджено ліпосомальні форми АТФ. Вплив ліпосомальної форми АТФ на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження. Експериментальних тварин поміщали в резервуар діаметром 1,5 м, завглибшки 0,8 м, заповнений водою з температурою 28–32 °С. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомної форми АТФ оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з

контрольними групами, які отримували АТР у вільному вигляді. Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах від 30 до 1 000 нм, хоча розміри переважної більшості ліпосом (W за кількістю = 91%) — в діапазоні від 30 до 100 нм (рис. 11) і лише незначна кількість фосфоліпідних структур (W за кількістю = 9%) мали розміри, що перевищують 100 нм.

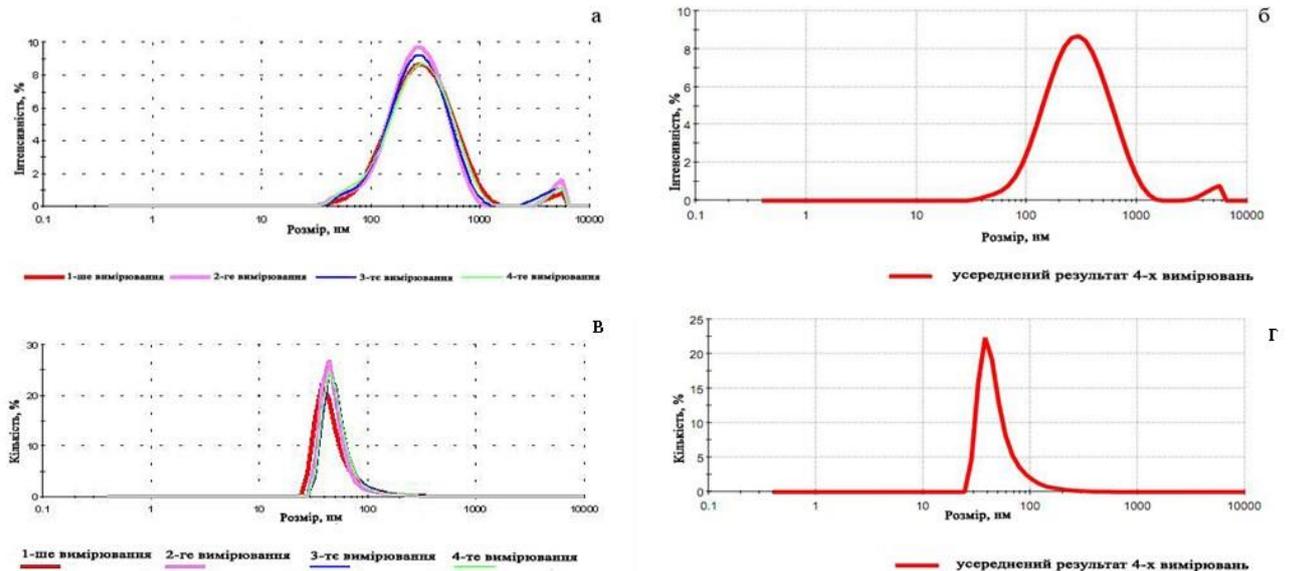


Рис. 11. Розподіл сумарної фракції ліпосомальної форми АТР за розмірами (а, б – в одиницях інтенсивності, в, г – за розмірами)

Результати дослідження функціональної ефективності ліпосомальної форми АТР наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

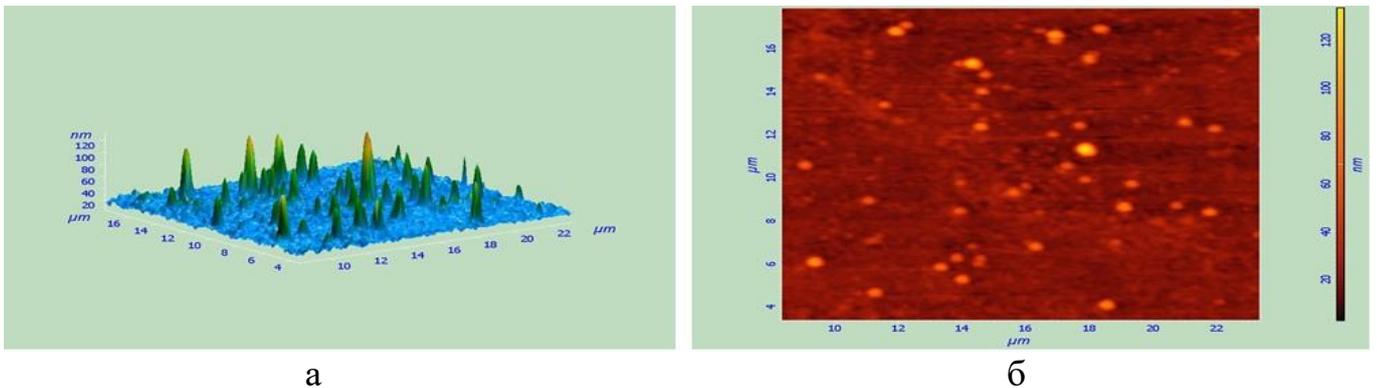
Дослідження функціональної ефективності ліпосомальної форми АТР

День експерименту	1 група	2 група	3 група	4 група	5 група	6 група
	Тривалість плавання, с					
6-й	138.4±5.5	142.5±3.5	144.5±2.7	149.9±4.6	234.8±5.1	264.3±7.1
12-й	138.9±6.5	144.5±3.7	145.2±3.9	148.3±5.1	237.6±4.7	286.3±9.4

Примітка. За порівняння з відповідною контрольною групою перша – інтактна група тварин, які утримувалися за стандартних умов віварію (прийнята за контроль); друга – група тварин, яким перорально вводили «порожні» ліпосоми з розрахунку 60мг/кг; третя – група тварин, яким перорально вводили АТР з розрахунку 30мг/кг; четверта – група тварин, яким перорально вводили АТР з розрахунку 60мг/кг; п'ята – група тварин, яким перорально вводили ліпосомальну форму АТР з розрахунку 30 мг/кг; шоста – група тварин, яким перорально вводили ліпосомальну форму АТР з розрахунку 60 мг/кг.

Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми куркуміну.

Співвідношення масових частин SFL, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, забезпечує отримання ліпосомальної форми куркуміну з урахуванням хіміко-фізичних властивостей куркуміну та залежності ефективності інкапсульованих зразків від розмірів везикул (важливий технологічний показник процесу). Для надання ліпосомам прийнятної жорсткості SFL і холестерол співвіднесені в пропорції 3,65:1,80, а для збільшення тривалості їх перебування в кровообігу, поліетиленгліколь залучають до них у кількості 0,04 масових частин. Розміри ліпосом з інкапсульованим куркуміном, за методом заморожування-танення, були в діапазоні від $98,13 \pm 4,80$ нм до $111,37 \pm 3,13$ нм, а методом сонікації – у діапазоні від $101,07 \pm 4,11$ нм до $114,71 \pm 3,48$ нм. Послідовна екструзія, з використанням мембран з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм., відповідно, забезпечує отримання стерильних ліпосомальних форм куркуміну з зовнішнім діаметром ліпосом $52,47 \pm 2,61$ нм. Вигляд ліпосом, виготовлених з фосфоліпідів соняшника, розмір яких досліджено за допомогою атомно-силової мікроскопії, показано на рис. 12.



а

б

Рис. 12. Вигляд ліпосом з фосфоліпідів соняшника: а) 3D-формат, б) на площині.

Визначення ефективності включення активних фармацевтичних інгредієнтів в ліпосоми. Ефективність інкапсуляції куркуміну. Кількість куркуміну в ліпосомах оцінювали шляхом розчинення заздалегідь визначеної кількості ліофілізованих ліпосом, завантажених куркуміном, в EtOH і обробці ультразвуком; суспензію центрифугували. Жовтуватий супернатант збирали, сушили під вакуумом і повторно суспендували в ацетонітрилі для кількісного аналізу вмісту куркуміну за допомогою ВЕРХ. Для визначення вмісту куркуміну в ліпосомах готували стандартний вихідний розчин із використанням 0,5 мг вільного куркуміну, розчиненого в 0,5 мл EtOH; після видалення органічного розчинника препарат ресуспендували в ацетонітрилі, різні концентрації отримували послідовними розведеннями, які використовували для проведення ВЕРХ-аналізу та формування калібрувальної кривої. Через заздалегідь визначені інтервали часу відбирали аліквоту суспензії (1 мл) і вимірювали коефіцієнт поглинання за довжини хвилі 420 нм. Ефективність включення (ЕЕ) куркуміну у ліпосоми, з вірогідністю $P = 0,95$ становила для методів заморожування – танення та сонікації $83,49 \pm 3,52\%$, а для екструзії через мембрани $95,34 \pm 3,76\%$.

Специфічні взаємодії між β -амілоїдними пептидами в β -амілоїдних гексамерах. Патогенез хвороби Альцгеймера (AD) супроводжується виникненням старечих бляшок, що складаються з бета-амілоїдних-пептидів (A β). A β має декілька гідрофобних амінокислотних залишків і, завдяки гідрофобній взаємодії між ними, A β можуть утворювати стабільні агрегати у воді, що призводить до утворення A β фібрил. Зокрема, міжмолекулярна взаємодія в двох β -листових ділянках сусідніх A β сприяє стабілізації агрегатів A β . Отже, речовини з сильною спорідненістю до β -листових ділянок, можуть інгібувати агрегацію A β і бути інгібітором патогенезу AD. Для розрахунків вибрали структурну модель (PDB ID: 2M4J) для A β фібрили *in vivo*, яка була отримана за допомогою твердотілого ЯМР (ssNMR) та EPR і мала специфічну для структури тривимірну симетрію щодо осі росту фібрил. Було побудовано 20 моделей A β гексамера і оптимізовано їх структури у воді методом ММ. На рис 16 показано оптимізована структура моделі 1, та моделі 19, яка визначена найбільш стабільною. В оптимізованих структурах гексамерів, бічні ланцюги заряджених залишків Asp23 та Lys28 утворюють сольовий місток у кожному з шести мономерів (D, E, F, G, H, I), що веде до щільної упаковки A β гексамерів. У воді взаємодія між мономерами складеної A β пари вносить більший внесок у стабільність гексамерів, ніж взаємодія між мономерами тримерів. Збільшена енергія взаємодії в парах Lys28 та Asp23, His13 та Glu11, Arg5 і Glu3, а також Arg5 і Asp7 для мономерів D і G. Зокрема, енергія взаємодії пари Lys28 – Asp23 та His13 – Glu11 найбільша, що вказує на важливість цих пар для стабілізації A β структури гексамера. Запропонована модель механізму агрегації A β : 1) A β -мономери складаються для утворення полімерів, таких як димери, тример тощо; 2) у цих полімерах виникає електростатична взаємодія групи NH₃⁺ бічного ланцюга Lys28 та групи COO⁻ бічного ланцюга Asp23 і можливо виникнення водневих зв'язків; 3) три полімери наближаються один до одного, щоб утворити тривимірну симетричну фібрилу, як показано на рис. 13.

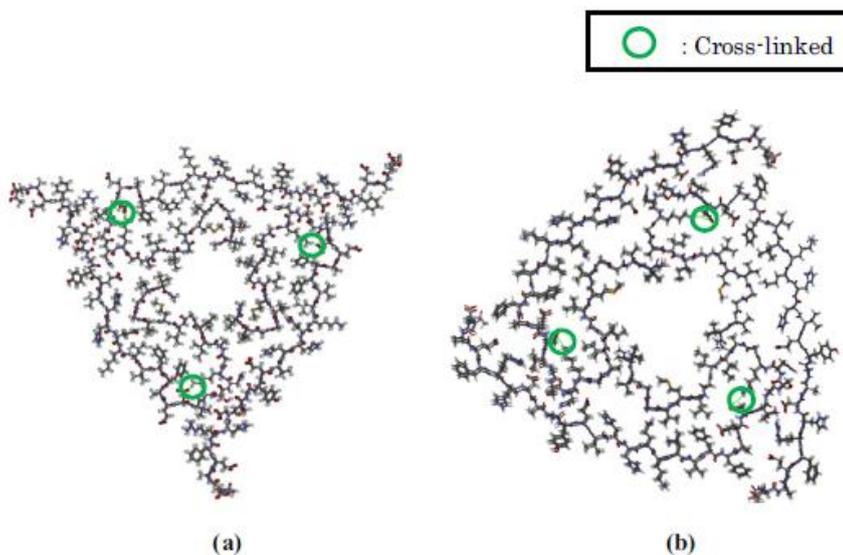


Рис. 13. Структури гексамерів A β , оптимізовані методом ММ у воді: **(a)** модель 1 та **(b)** модель 19 (найбільш стабільна). Тривимірна симетрія зберігається за рахунок взаємодії між мономерами (Asp23 та Lys28), що існують в одному шарі.

Конформаційні зміни β -амілоїдних мономерів в β -амілоїдних нонамерах.

Як початкову використовували структуру PDB ID: 2M4J. Будували 20 моделей $A\beta$ (1-40) нонамерів, кожна модель складалась з трьох складених шарів тримера $A\beta$ (1-40). В розрахунках використовували нонамер побудований з мономерів $A\beta$ (1-40) структури моделі 19 гексамера. Протонізація залишків гістидину в нонамерах визначали як His +, а N- і C-кінці кожного $A\beta$ -пептиду закінчувались незарядженим ацетилом і групою NH_2 відповідно. Структурні зміни в $A\beta$ (1-40) нонамерах аналізували на моделі 1 (рис. 14). З часом домен N-терміналу тримера ВЕН, який складається з трьох складених мономерів (В, Е і Н), починає віддалятися від сусіднього тримера СFI. В результаті N-кінцевий домен тримера В-Е-Н повністю відокремлюється від іншої частини $A\beta$ (1-40) нонамера, хоча С термінал і домени повороту В-Е-Н практично не змінюють положення. Отже, N термінал тримера В-Е-Н в моделі 1 $A\beta$ (1-40) нонамера легко деформується внаслідок теплових коливань, а модель 19 $A\beta$ (1-40) нонамера зберігає симетрію, як показано на рис. 15. Для з'ясування причини, чому така велика різниця в структурних змінах між моделями 1 і 19 для $A\beta$ (1-40) нонамерів порівнювали вихідні структури цих моделей. N-термінал домена в структурі моделі 1 зміщуються назовні від $A\beta$ (1-40) нонамера під дією тепла і може бути легко деформований на відміну від структури моделі 19 (рис. 16). Стабільність $A\beta$ нонамерів та специфічні взаємодії між їх $A\beta$ пептидами досліджували в водному оточенні. Енергія взаємодії між пептидами пар $A\beta$ (А-D, В-Е, С-F, D-G, Е-Н та F-I) значно більша порівняно з іншими, а енергія взаємодії між $A\beta$ пептидами С і F найбільша (табл. 4). Такі пари уворюються між укладеними пептидами сусідніх шарів. Запропоновано модель етапів $A\beta$ агрегації: (1) $A\beta$ -мономери укладаються, утворюючи пару, інші мономери додатково укладаються, щоб зробити більші укладені агрегати, такі як тример $A\beta$ і тетрамер; (2) в укладених агрегатах $A\beta$ електронний заряд розподіляється по амінокислотним залишкам, що виходять на N-термінал та домени повороту. Стабільність сольватированного $A\beta$ -нонамера залежить суттєво від молекул води, що оточують нонамер; (3) завдяки електростатичній взаємодії між зарядженими частинами укладених структур, деякі агрегати $A\beta$ наближаються один до одного і утворюють великі $A\beta$ агрегати.

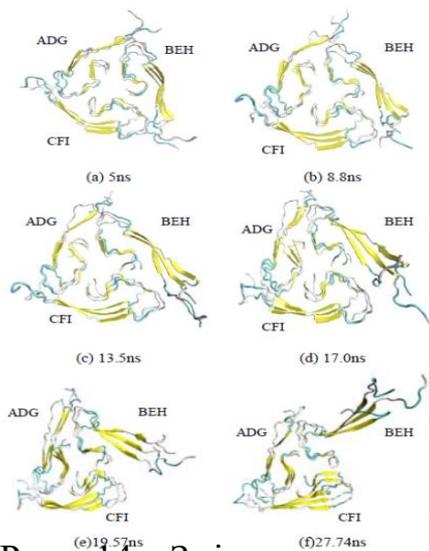


Рис. 14. Зміна структур для моделі 1 $A\beta$ (1-40) нонамера протягом 30 нс. Моделювання МД у воді.

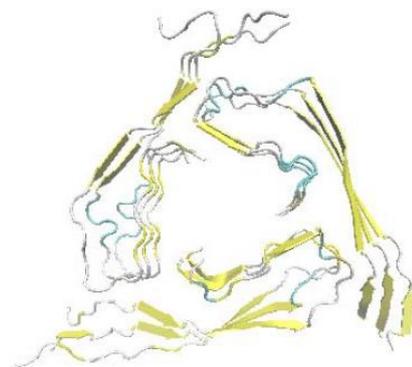


Рис. 15. Структура моделі 19 для $A\beta$ (1-40) нонамера, отриманого МД моделюванням у воді; знімок за 30 нс.

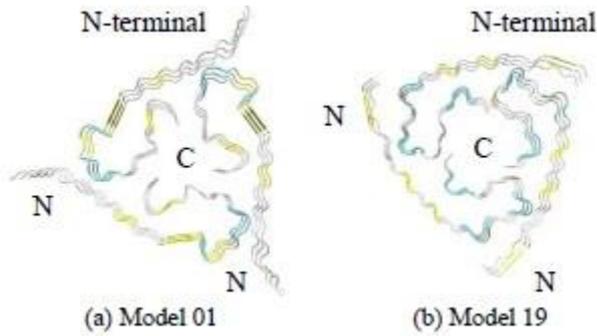
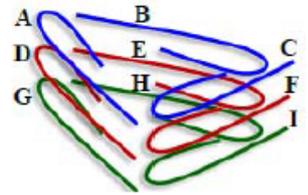


Рис. 16. Структури Аβ (1-40) нонамера для моделей 1 і 19 з трикратною симетрією, отримані за допомогою оптимізації ММ у воді.

Таблиця 4

Енергії взаємодії (ккал / моль) між мономерами нонамеру Аβ (1-40) для найбільш стабільної структури, визначеної розрахунками ФМО

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Upper	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	-48.4	-	-	-	-	-	-	-
	C	-55.9	-61.3	-	-	-	-	-	-
Middle	D	-373.1	-16.0	-20.1	-	-	-	-	-
	E	-8.2	-393.5	-13.0	-100.0	-	-	-	-
	F	-12.2	-10.9	-398.5	-95.9	-65.4	-	-	-
Lower	G	77.4	-12.8	-8.1	-269.5	-25.8	-12.2	-	-
	H	-0.5	65.9	-9.5	-18.0	-321.9	-12.8	-82.0	-
	I	-10.4	-6.9	65.6	-21.8	-11.9	-360.5	-97.3	-47.3



Специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних фібрилах. Для аналізуваня *in vivo* Аβ фібрили побудували дві моделі Аβ гексамера. На рис. 17 представлено 3D формат структури PDB ID: 2M4J, яка складається з Аβ мономерів А, В, С, D, Е, F, G, H, I. Перший гексамер, який називається верхнім гексамером, складається з першого та другого шарів нонамера, а другий - нижчий гексамер утворюється з другого і третього шарів. Ці гексамери - це моделі для дослідження яких сили взаємодії між Аβ мономерами в тримері або між ними вносять значний вклад в стабілізацію нонамера. У верхньому гексамері мономери А і D, С і F, а також В і Е складають відповідні пари, 1276 молекул води оточують ці Аβ пари, а також знаходяться в центральній порожнині Аβ гексамера. Молекули води суттєво сприяють стабілізації Аβ мономерів в Аβ гексамері. Як показано на рис. 18, дві молекули води утворюють мережу водневих зв'язків між бічними ланцюгами Glu22 (Е) та Arg5 (F). Крім того, заряджена групи Arg5 (F) взаємодіє з СОО-групою Asp23 (Е). Існує також взаємодія заряджених груп Lys28 (Е) та Asp7 (F). Взаємодія мономерів Е і F пов'язана з мережею водневих зв'язків з молекулами води, а також електростатичною взаємодією між зарядженими групами залишків. Модель для механізму агрегації Аβ: (1) Аβ мономери складаються для утворення полімерів, таких як димери, тример тощо. (2) полімери мають позитивні та негативні заряди на заряджених залишках повороту та N кінцевих областях. (3) три полімера наближаються один до одного для утворення фібрил. На цьому етапі електростатична взаємодія між зарядженими залишками в домені повороту та N-кінцевому домені і його сусіднім полімером сприяє руху цих залишків ближче один до одного і утворенню фібрил.

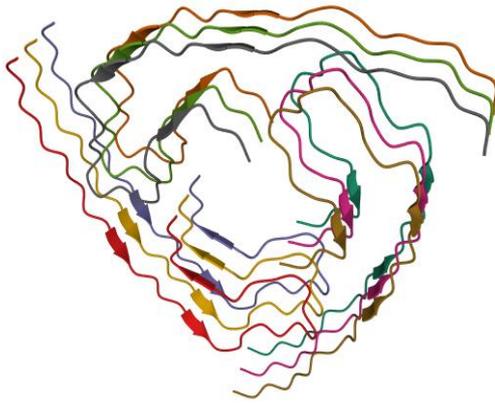


Рис. 17. Просторова структура моделі Аβ фібрил *in vivo*, PDB: 2M4J.

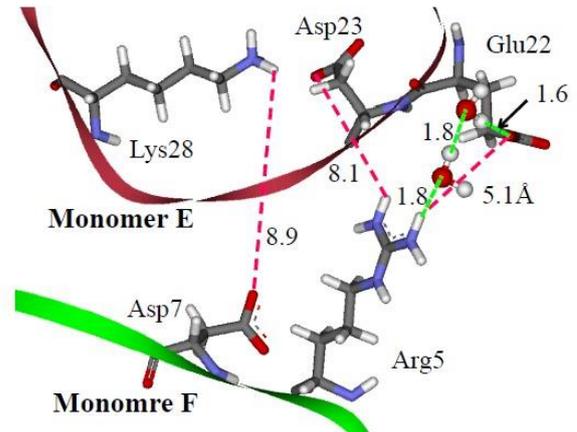


Рис. 18. Взаємодія залишків мономерів Е і F у нижньому гексамері Аβ; дві молекули води мостують між Glu22 і Arg5 за допомогою водневих зв'язків.

Вплив іона Zn на структуру та електронні стани β-амілоїдних наномерів. Агрегати амілоїд-бета білків (Аβ) тісно пов'язані з патогенезом АD. Агрегати Аβ різних розмірів від димерів до фібрил було виявлено у мозку хворих на АD. Крім цього, було виявлено і аномальне накопичення іонів металів Zn, Cu і Fe та асоціація між Аβ агрегатами і іонами цих металів. Досліджено вплив іонів Zn на стабільність Аβ-агрегатів з та без іонів Zn і зміни структури Аβ-агрегатів індукованих іонами Zn. Виявлено: 1) Структура Аβ-нонамера з тривимірною симетрією нестійка у воді рис 19. (2) В Аβ нонамері взаємодія між укладеними Аβ мономерами сильніша, ніж у мономерів, що утворюють Аβ тример в тому ж шарі. (3) Завдяки додаванню трьох іонів Zn до Аβ нонамера його структура відчутно стабілізується, щоб зберегти свою тривимірну симетрію рис 20. (4) У комплексі Аβ нонамер + Zn два іони Zn координуються до негативно заряджених COO^- груп Glu11, що існують у N-кінцевій частині Аβ мономерів, сприяючи стабілізації комплексу рис 21.

Специфічні взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ. Туберкульоз (ТВ), одне з найпоширених інфекційних захворювань, яке викликано паличкою *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). FtsZ відіграє важливу роль у формуванні клітинних стінок в процесі клітинного ділення. Як показано на рис. 22а, FtsZ має сайт зв'язування з гуанозинтрифосфатом (GTP). Коли FtsZ утворює Z-кільце, як показано на рис. 22b, GTP зв'язується з GTP-сайтом зв'язування FtsZ. Згодом сайт петлі T3 FtsZ координує до GTP, утворюючи стабільний комплекс FtsZ димерів, які утворюють волокнистий агрегат. Крім того, сайт петлі T7 FtsZ діє на GTP сусіднього FtsZ і гідролізує GTP до гуанозиндифосфату (GDP). Zantrin Z3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine) та його диметил ZZ3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine) досліджували як інгібітори та їх специфічні взаємодії з FtsZ. Оскільки сайти зв'язування FtsZ з інгібіторами Z3 і ZZ3 не визначено, можливі сайти зв'язування обирали як показано на рис. 26. Перш за все, сайт GTP / GTP FtsZ + GDP

комплекс (PDB ID: 1RQ7) був визначений А-сайтом. Структура FtsZ передбачала сім сайтів кандидатів на зв'язування з Z3 та ZZ3, ці сайти були визначені як В, С, D, Е, F, G та Н, як показано на рис. 23. З'ясовано особливості взаємодії Z3 та ZZ3 з FtsZ та уточнено структурні особливості їх зв'язування: (1) Z3 та ZZ3 зв'язуються з В-сайтом, що містить петлю Н6/Н7 і Н7, а не з місцем зв'язування GTP / GDP до FtsZ; (2) ZZ3 має більш високу спорідненість до FtsZ, ніж Z3; (3) Met163, Gly164, Ser176, Glu179 та Ala235 сприяють зв'язуванню ZZ3 з FtsZ; (4) Z3 та ZZ3 ефективні для інгібування агрегації FtsZ шляхом зміни конформації петлі Н6/Н7, що сприяє агрегації. (5) На основі ZZ3 можливо запропонувати більш потужні інгібітори, які зв'язують сильніше з В-сайтом петлі Н6 / Н7 FtsZ.

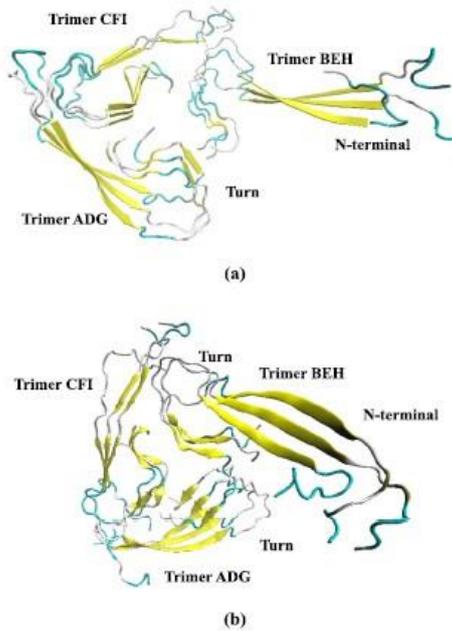


Рис. 19. Структури знімків для Аβ-нонамера без Zn, отримані методом MD моделювання у воді; (а) при 27,740 нс і (б) при 100 нс.

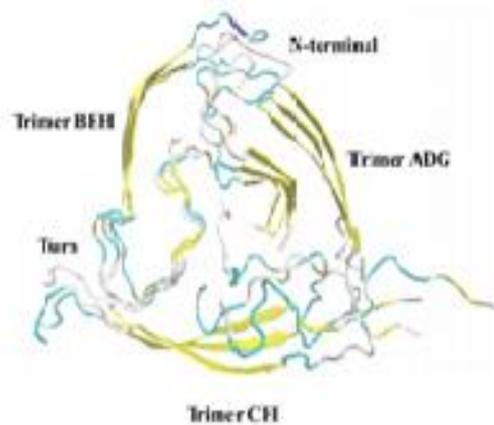


Рис. 20. Структура комплексу Аβ нонамер + Zn, отримана методом моделювання MD при 27,734 нс.

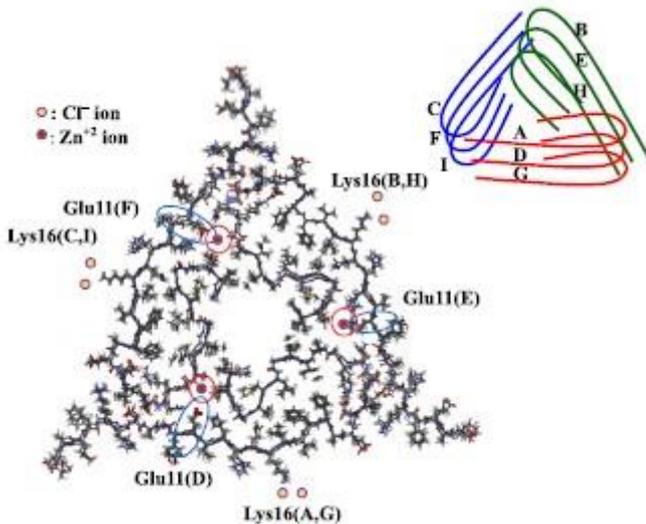


Рис. 21. Початкові позиції іонів Zn та Cl⁻ в Аβ-нонамері + Zn комплекс для моделювання MD; Іони Zn розміщені поблизу негативно зарядженого залишки Glu11, тоді як іони Cl⁻ розміщені поблизу Lys16. Показано схематичне зображення дев'ять Аβ мономерів від А до І.

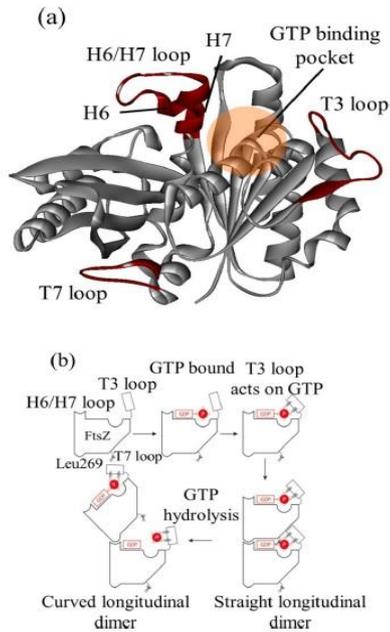


Рис. 22. Схема механізму утворення Z-кільця білками FtsZ та GTP. (а) GTP-кишеня для прив'язки FtsZ та деякі петлі (червоні), що сприяють утворенню волокнистого заповнювача FtsZ, (б)

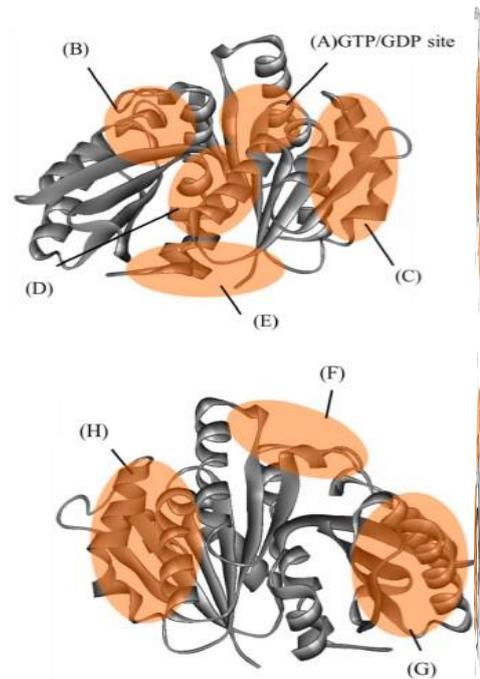


Рис. 23. Запропоновані нами сайти зв'язування інгібіторів (Z3 та ZZ3) на FtsZ.

Взаємодія куркуміну і його похідних з β -амілоїдним пептидом: молекулярне моделювання методом *ab initio*. AD викликана накопиченням β -амілоїдних пептидів у мозку людини. А β пептид утворюються як шляхом розщеплення β -секретазою, так і γ -секретазою білка-попередника амілоїду (APP). Для придушення продукції цих патогенних пептидів необхідно мати інгібітори процесу розщеплення APP, сполуки, які специфічно зв'язуються з місцем розщеплення APP та інгібують атаки γ -секретази. APP має 770 залишків і складається з трьох доменів; (i) N-кінцевий ектодомен (залишки 18–624), що знаходиться в позаклітинному просторі, (ii) одинарний гідрофобний трансмембранний домен (TMD, залишки 625–648) та (iii) короткий внутрішньоклітинний домен (AICD, залишки 649–695). Двоступеневим розщепленням APP β - та γ -секретазами, утворюються А β пептиди, що мають 37–43 амінокислотні залишки. 28 залишків у пептиді належать до позаклітинного домену, тоді як інші залишки належать до мембранного домену. А β 42 та А β 40 утворюються з розщеплення APP γ -секретазою в місцях Ala713 та Val711, відповідно. Утворення пептидів А β 42 та А β 40 запобігається шляхом зв'язування деяких пептидів із сайтом розщеплення APP γ -секретазою.

Структурні формули куркуміну I, II, III та запропоновані нові його структури представлено на рис. 24. Як початкова структура APP використовували структуру (PDB ID: 2LZ3) і є частковою структурою APP770, що складається з 28 амінокислот від залишків Lys699 до Lys726 APP770. Місце розщеплення APP770 за допомогою γ -секретази – Ala713 для отримання Ab 42 і Val711 для виробництва Ab 40,

відповідно. Далі цей короткий пептид APP позначається APP28. Ala713 APP770 відповідає Ala19 APP28, тоді як Val711 APP770 відповідає Val17 APP28. Відзначається, що нумерація залишків зміщена на 694 з APP770 на APP28. Дослідження стабільних структур комплексів APP + куркумін у воді виявили, що куркумін I зв'язується з APP таким чином, що покриває сайт розщеплення APP γ -секретазою і може завадити розщепленню APP. Взаємодію можна посилити шляхом введення деяких груп в центральну частину куркуміну I (рис. 24). Визначено, що куркумін VI має найбільшу енергію зв'язування з APP серед запропонованих похідних куркуміну. Куркумін VI охоплює сайт Ala19 APP і може бути інгібітором утворення A β 42. Куркумін XIV зв'язується з APP та взаємодіє електростатично із залишком APP Ala19 і потенційно може захистити місце розщеплення Ala19 APP від атаки γ -секретази і зменшує можливість вироблення патогенного пептида A β 42.

Природні сполуки з спорідненістю до зв'язування з A β також можуть бути ефективними для запобігання агрегації A β та лікування AD. Кверцетин (PDB: 2O3P), EGCG (PDB: 3O0B), апігенін (PDB ID:4W00) і куркумін-I (PDB ID: 5ZTN) було запропоновано як інгібітори-кандидати A β агрегації. Їх хімічні структури показані на рис. 25.

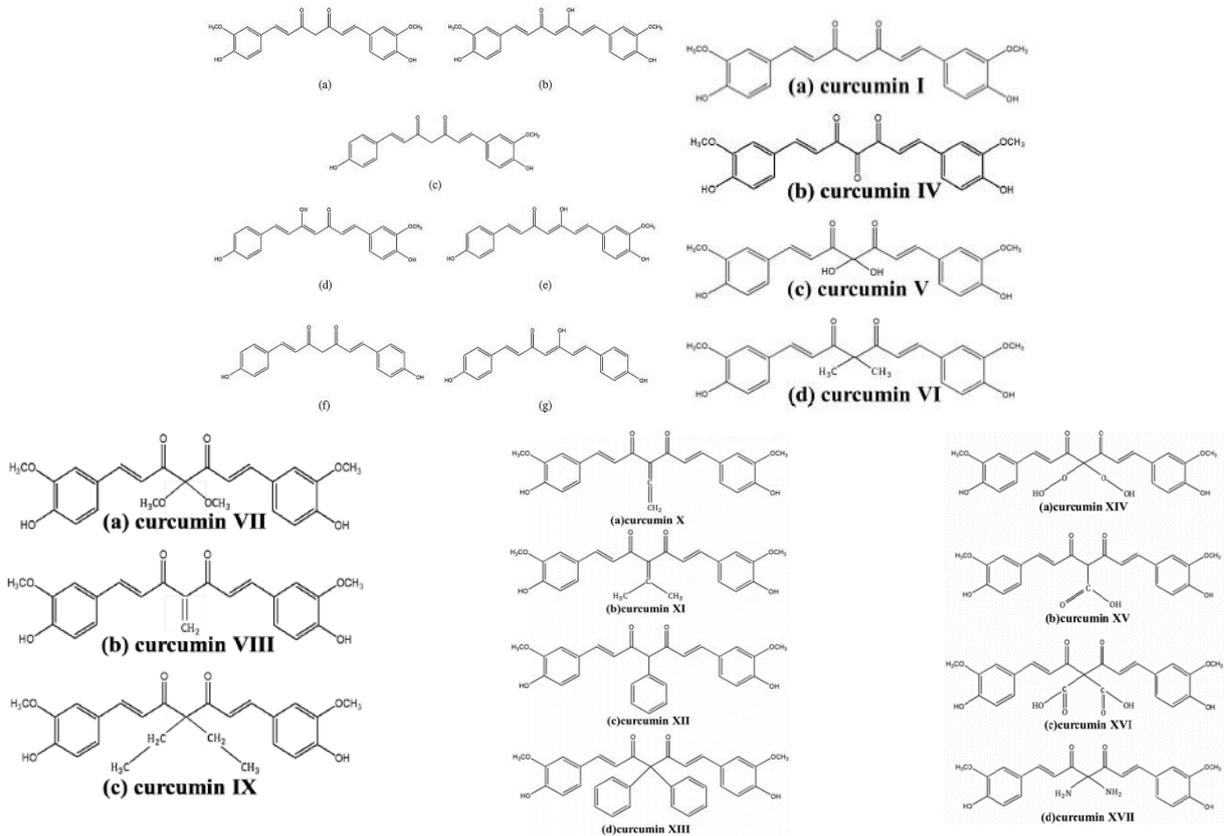


Рис. 24. Хімічна структура (a) куркумін I, (b) 9-кето 11-енол куркумін I, (c) куркумін II, (d) 9-енол 11-кето куркумін II, (e) 9-кето 11-енол куркумін II, (f) куркумін III, (g) 9-кето 11-енол куркумін III та структури нових лігандів куркумін IV, куркумін V та куркумін VI, куркуміну VII, куркуміну VIII, куркумін IX, куркуміну X, куркуміну XI, куркуміну XII, куркуміну XIII, куркуміну XIV, куркуміну XV, куркуміну XVI та куркуміну XVII, запропоновані в цьому дослідженні.

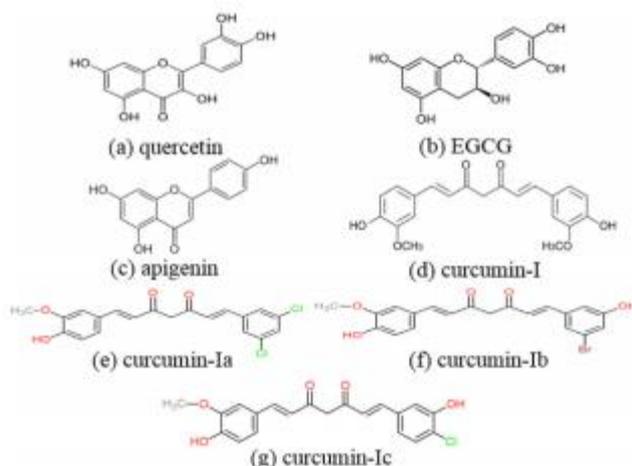


Рис. 25. Хімічні структури існуючих та запропонованих нами нових інгібіторів для А β ; (a) кверцетин, (b) EGCG, (c) апігенін, (d) куркумін-I, (e) куркумін-Ia, (f) куркумін-Ib та (g) куркумін-Ic.

Енергія взаємодії (ВЕ) куркуміну-Ib набагато більша ніж у інших інгібіторів А β . Основною причиною такої великої ВЕ є сильна взаємодія між куркуміном-Ib та Lys16. Замінивши групу OCH₃ з OH-групою в куркуміні-I стерично об'ємна частина куркуміну-I зникає. В результаті куркумін-Ib може потрапляти в ліганд ділянку зв'язування А β легше і утворює багато водневих зв'язків з залишками А β .

Взаємодія похідних куркуміну з Тау протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio*. Ланцюг мономера А у Тау - філаменті (PDB ID: 5O3L) використовували як початкову структуру Тау білка, ефект сольватації білка моделювали молекулами води шаром 8 Å навколо нього. Структури куркуміна та його похідних, як інгібіторів-кандидатів агрегації білків Тау, показано на рис. 26. Енергія взаємодії (ВЕ) між куркуміном та його похідними і тау білком вираховували із сумарних енергій (ТЕ) складових комплексу, використовуючи наступне рівняння.

$$VE = TE (\text{комплекс} + \text{вода}) - TE (\text{Тау} + \text{вода}) - TE (\text{похідні} + \text{вода}) + TE (\text{вода})$$

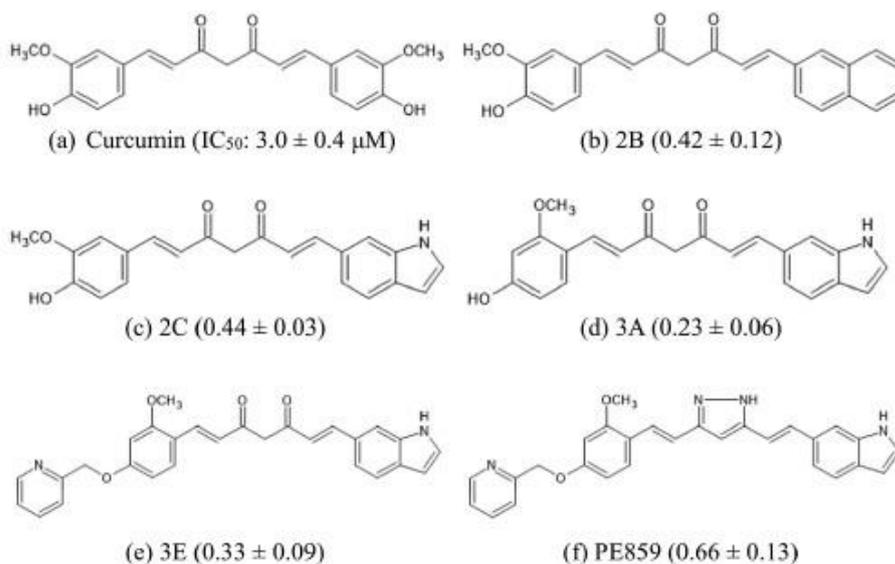


Рис. 26. Хімічні структури та значення IC₅₀ [1] (мМ) куркуміну та його похідних: (a) куркумін, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E та (f) PE859.

PE859 має найнижчу BE серед досліджених похідних. Через групу піразолів у центрі PE859 зв'язується з багатьма залишками білка Тау. Модифікація індольного кільця PE859 призводить до посилення взаємодії з Тау білком.

Взаємодія похідних куркуміну з FtsZ протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio*. Для моделювання FtsZ використовували як вихідну структуру Mtb FtsZ плюс цитратний комплекс (PDB ID: 1RQ2). Ця структура FtsZ – димер складений з двох субодиниць (ланцюг-А та ланцюг-В). Структуру ланцюга-А використовували як початкову структуру FtsZ, і ця структура мала відповідні сайти зв'язування і кишені для ліганда – куркуміни I, II та III. Для отримання стабільних структур комплексу FtsZ і структур кандидатів, проведено оптимізацію у воді за допомогою класичного методу ММ (2100 молекул води, в межах 8 Å від поверхні комплексу).

Енергію взаємодії (BE) між FtsZ та куркуміном вираховували із сумарних енергій (TE) складових комплексів, використовуючи рівняння:

$$BE = - TE (\text{комплекс} + \text{вода}) + TE (\text{FtsZ} + \text{вода}) + TE (\text{куркумін} + \text{вода}) - TE (\text{вода})$$

Визначили вісім сайтів зв'язування куркуміна і FtsZ (рис. 27). Сайт GDP - це GDP сайт зв'язування комплексу FtsZ + GDP (PDB ID: 1RQ2), Tzt сайт - сайт зв'язування Tzt комплексу FtsZ + Tzt (PDB ID: 3E22). Сайт, структурно еквівалентний сайту таксол/тубулін, що знаходиться між двома субодиницями петлі T7 FtsZ. Крім того, в результаті молекулярного моделювання було отримано інші п'ять сайтів зв'язування (C, E, F, G і H) куркуміна і FtsZ. Куркуміни переважно зв'язуються з сайтом Tzt. Залишки FtsZ білка Arg152, Ile214, Ala218, Gln255, Phe312 та Asp349 сприяють зв'язуванню куркуміна. Куркумін-III, завдяки водневим зв'язкам між центральними карбонільними групами куркуміна-III та Gln255 і Phe312, сильніше зв'язується з FtsZ порівняно з куркумінами I і II.

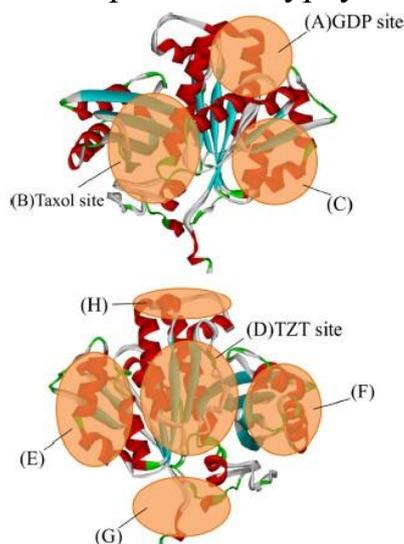


Рис. 27. Сайти зв'язування куркуміну на FtsZ.

Взаємодія куркуміну з сайтами рестрикції AβPP. Куркумін здатен взаємодіяти з агрегатами і фібрилами β-амілоїдних пептидів, крім того не виключена можливість взаємодії куркуміну з сайтами процесінгу AβPP відповідними секретазами. Досліджено моделюванням *in silico* докінгу куркуміна з

нормалізувалась, натомість зростав рівень IL-6 (на 49 %) і IL-10 (на 83 %), порівняно з показниками на початок місяця. Але при порівнянні показників цитокінів гіпокампу щурів груп 3 і 4 стає зрозумілим специфічне зниження рівнів IL-1 β (на 33 %), TNF α (на 24 %), IL-6 (на 34 %) і IL-10 (на 99 %), обумовлене інгібуючою дією куркуміну (табл. 5). Антицитокіновий ефект куркуміну можна пояснити його здатністю інгібувати активацію запального фактору транскрипції NF κ B, пригнічуючи фосфорилування і деградацію I κ B α (інгібітору NF κ B) (табл. 6, 7). Вплив ліпосомного куркуміну на цитокінові показники у гіпокампі тварин з інтрагіпокампульним введенням A β 42_Human позначився суттєвим пригніченням запалення: рівень TNF α зменшився на 56 %, IL-6 – на 39 %, IL-10 – на 52 %, відповідно. Проте, концентрація жодного з цитокінів не нормалізувалась. Ефект куркуміну у складі ліпосом у неокортексі щурів з моделлю AD виявив аналогічне пригнічення цитокінової реакції: рівень TNF α зменшився на 71 %, IL-6 – на 67 % і IL-10 – на 41 %, відповідно. У гіпокампі щурів з моделлю AD ліпосомальна форма куркуміну виявила більш інтенсивне пригнічення цитокінової ланки нейрозапалення, порівняно з його водним розчином.

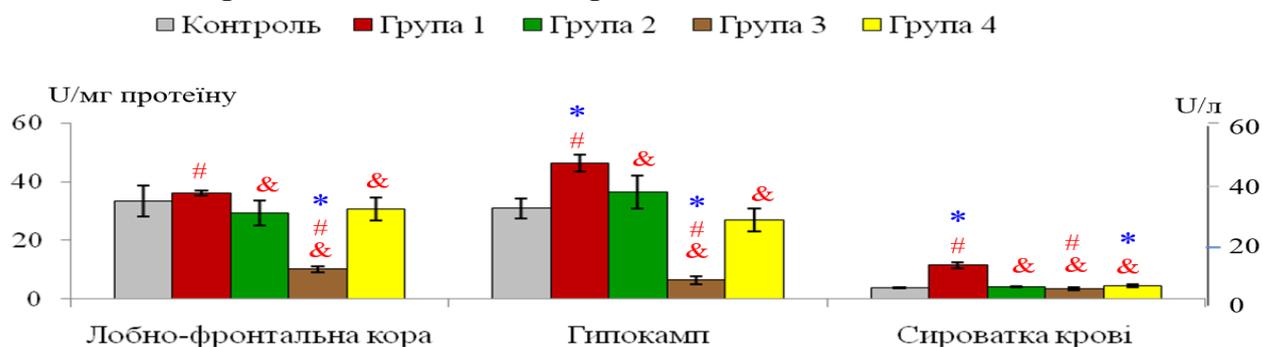


Рис. 29. Дія β -амілоїдного пептида 42_Human і ліпосомальної форми куркуміну на ангіотензин-перетворюючу активність у відділах головного мозку (лобно-фронтальна кора і гіпокамп) і сироватці крові щурів.

Таблиця 5

Вплив ліпосомальної форми куркуміну на TNF α , IL-6 і IL-10 у гіпокампі головного мозку щурів з моделлю хвороби Альцгеймера

Цитокін	Контроль n=6	Група 1 n=6	Група 2 n=6	Група 3 n=6	Група 4 n=6
TNF α	50.7 \pm 2.1	63.8 \pm 3.5	46.8 \pm 1.9	28.3 \pm 1.7	46.3 \pm 2.3
IL-6	57.3 \pm 8.3	72.8 \pm 6.8	98.3 \pm 6.8	44.7 \pm 5.9	58.5 \pm 8.2
IL-10	130.4 \pm 11.0	254.3 \pm 16.7	152.8 \pm 12.9	122.4 \pm 13.4	151.0 \pm 12.4

Примітка. Тут і далі контроль – інтактні щури; група 1 – тварини з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера (інтрагіпокампульна дія A β 42_Human); група 2 – фальш-оперовані щури; група 3 – назальна терапія куркуміном у ліпосомах щурів з моделлю AD; група 4 – назальна терапія порожніми ліпосомами щурів з моделлю AD.

Таблиця 6

Вплив ліпосомальної форми куркуміну на TNF α , IL-6 і IL-10 у лобно-фронтальній корі головного мозку щурів з моделлю хвороби Альцгеймера

Цитокін	Контроль n=6	Група 1 n=6	Група 2 n=6	Група 3 n=6	Група 4 n=6
TNF α	50.8 \pm 2.5	46.2 \pm 2.4	40.6 \pm 2.9	13.2 \pm 0.9	47.1 \pm 2.8
IL-6	52.5 \pm 4.2	80.8 \pm 7.4	68.5 \pm 5.8	26.8 \pm 2.0	49.3 \pm 3.9
IL-10	179.5 \pm 13.0	150.8 \pm 10.6	206.4 \pm 24.2	89.4 \pm 7.6	177.0 \pm 12.8

Таблиця 7

Вплив ліпосомальної форми куркуміну на TNF α , IL-6 і IL-10 у сироватці крові щурів з моделлю хвороби Альцгеймера

Цитокін	Контроль n=6	Група 1 n=6	Група 2 n=6	Група 3 n=6	Група 4 n=6
TNF α	7.9 \pm 0.8	9.5 \pm 0.6	10.7 \pm 1.0	10.4 \pm 0.4	11.9 \pm 0.9
IL-6	48.3 \pm 10.4	37.5 \pm 6.9	53.2 \pm 11.3	44.8 \pm 7.7	47.0 \pm 14.1
IL-10	19.5 \pm 2.4	9.8 \pm 1.2	6.5 \pm 0.9	7.0 \pm 1.8	9.3 \pm 2.5

Назальна терапія водним розчином куркуміну у щурів з моделлю доклінічного етапу AD (інтрагіпокампальне введення гомоагрегатів A β ₄₂) обумовила зменшення вмісту цитокінів і пригнічення ангіотензин перетворювальної активності в головному мозку, але не в сироватці крові цих тварин. У результаті куркумінової терапії відзначалося поліпшення пам'яті дослідних щурів (рис. 30). Виявлена позитивна динаміка антизапального впливу водного розчину куркуміну *in vitro* на транскрипційному і трансляційному рівнях утворення цитокінів мононуклеарами, а також встановлено його безпосередній пригнічуючий ефект на рівень ендogenous A β ₄₀ за умов токсичної дії екзогенного A β ₄₂. Встановлено, що гомоагрегати A β ₄₂ викликали накопичення ендogenous A β ₄₀ у мононуклеарах. Куркумін істотно запобігав збільшенню концентрації A β ₄₀ у клітинах та вірогідно зменшував його секрецію, обумовлену токсичним впливом екзогенного A β ₄₂.

Для прозапальних цитокінів (IL-1 β і TNF α) за інкубації мононуклеарів *in vitro* з екзогенним A β ₄₂ було встановлено збільшення внутрішньоклітинного вмісту TNF α і відсутність накопичення IL-1 β у клітинах, що завдячувало істотній секреції цих запальних месенджерів до інкубаційного середовища. Додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект A β ₄₂ на мононуклеарний пул цих цитокінів, що позначилося зменшенням їх позаклітинного пулу. Динаміка накопичення і секреції IL-6 мононуклеарами характеризувала цей інтерлейкін другої хвилі запальної відповіді, як не схильного до внутрішньоклітинного накопичення. Токсична дія A β ₄₂ пригнічувала накопичення IL-10 в мононуклеарних клітинах, але не впливала на

його секрецію. Додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

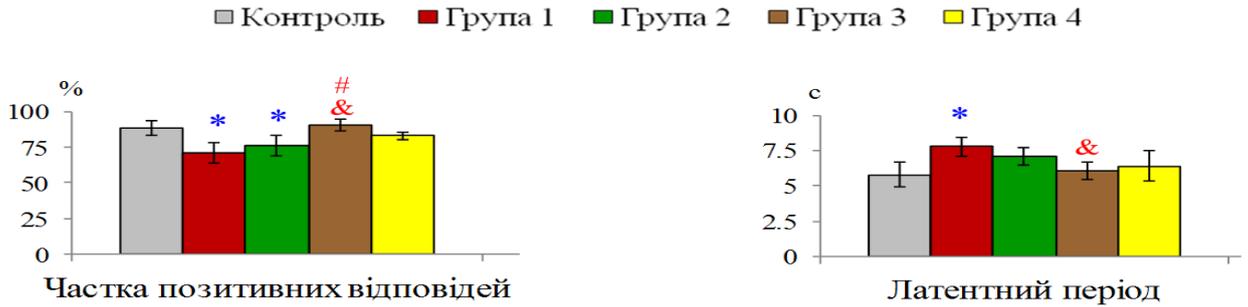


Рис. 30. Динаміка показників мнестичних властивостей і пам'яті (частка позитивних реакцій і латентний період) за дію β -амілоїдного пептиду 42_Human і терапії ліпосомальною формою куркуміну у щурів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати комплексного дослідження молекулярних механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. З'ясовано молекулярний механізм такої взаємодії та запропоновано використання куркуміну в ліпосомальній формі для пригнічення виникаючих запалень.

1. Розроблено технологію сухого знежиреного лецитину (суміші фосфоліпідів) з фосфатидного концентрату олії соняшника з використанням екстракції ацетоном. Знайдено співвідношення олія фосфатидного концентрату соняшника : розчинник (ацетон) для максимального вилучення фосфоліпідів.

2. Розроблено методику, яка дозволяє визначити якісний і кількісний склад суміші фосфоліпідів за допомогою рідинної хроматографії. Визначено жирнокислотний склад фосфоліпідів. Основними насиченими жирними кислотами лецитину є пальмітинова кислота (16:0) і стеаринова кислота (18:0), а ненасиченою – лінолева кислота (18:2, омега-6). Пальмітинова та лінолева жирні кислоти по-різному рекомбіновані в складі молекул фосфоліпідів соняшника.

3. Проведено порівняння методів створення одношарових та багатошарових ліпосом шляхом заморожування/танення, метод сонікації та метод екструзії через мембрани. За допомогою методу лазерного кореляційного розсіювання та атомно-силової мікроскопії визначено розміри «порожніх» ліпосом в залежності від методу їх отримання. Встановлено, що для створення ліпосомальної форми АТР найбільш придатний метод заморожування–танення, а для куркуміну – методи сонікації та екструзії через мембрани (ефективність включення 95-98%).

4. Показано, що ліпосоми з фосфоліпідів соняшника є більш стабільними до ініційованого окиснення, ніж ліпосоми з фосфоліпідів сої та яєчного жовтка. Визначено, що стабільність ліпосом з фосфоліпідів соняшнику обумовлена наявністю хлорогенової кислоти (0.8%) та α -токоферолу (0.07%). Запропоновано

новий підхід до лікування хвороби Альцгеймера з врахуванням ключової ролі ліпосомальної форми куркуміна. Встановлено, що куркумін може впливати на процес утворення А β -мономерів.

5. Запропоновано модель агрегації А β і утворення фібрил. Визначено, що для сольватованого гексамера А β , який складений з тримерів та молекул води, взаємодії між мономерами складеної пари А β вносять найбільший вклад у стабільність гексамера, ніж взаємодії мономерів тримера. З'ясовано, що заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg5, Asp7, Glu22, Asp23 та Lys28 в основному сприяють взаємодії між парами мономерів і взаємодії молекул води, що утворюють мережі водневих зв'язків між зарядженими залишками та підвищують стабільність сольватованого гексамера А β .

6. Показано зміну структури та взаємодії між мономерами А β в нонамерах А β з та без іонів Zn. Додавання трьох іонів Zn в нонамер А β стабілізувало його структуру. Для комплексу А β нонамер + Zn, два іони Zn координувались до негативно заряджених COO⁻ груп Glu11 в N-кінцевій частині А β мономерів, що сприяло стабілізації комплексу. Однак механізм агрегації посилений іонами Zn не з'ясовано.

7. За допомогою методів докінгу і молекулярної динаміки встановлено що куркумін може втручатися у процес утворення А β -мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесінгу попередника β -амілоїдних пептидів (A β PP_63Rat). Показано можливість утворення стійких комплексів між куркуміном та I і II сайтами рестрикції протеїну попередника А β . Куркумін не лише виступав деструктором уже сформованих агрегатів β -амілоїдних пептидів, а й впливав на процес утворення їх мономерів шляхом взаємодії з сайтами ензимного протеолізу А β PP.

8. Запропоновані три похідні куркуміну-I, що мають фармацевтичні властивості, та виявлено, що куркумін-Ib має більшу енергію зв'язку з А β , ніж існуючі інгібітори, що вказує на можливість його застосування як інгібітора агрегації А β (терапевтичний ефект), яка вважається початковим етапом виникнення хвороби Альцгеймера. Інгібітори – сполуки з високою спорідненістю до А β , ефективні для запобігання агрегації А β і лікування хвороби Альцгеймера

9. Встановлено, що назальна терапія куркуміном у ліпосомальній формі для щурів з моделлю доклінічного етапу хвороби Альцгеймера (інтрагіпокампальне введення гомоагрегатів А β ₄₂) обумовила пригнічення ангіотензин перетворювальної активності та виявила більший антицитокіновий потенціал у гіпокампі щурів, що призвело до відновлення показників пам'яті тварин.

10. Для прозапальних цитокінів (IL-1 β і TNF α) за інкубації моонуклеарів *in vitro* з екзогенним А β ₄₂ було встановлено збільшення внутрішньоклітинного вмісту TNF α і відсутність накопичення IL-1 β у клітинах, Додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект А β ₄₂ на моонуклеарний пул цих цитокінів, Токсична дія А β ₄₂ пригнічувала накопичення IL-10 в моонуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

11. Отримані дані науково обґрунтовують впровадження нових підходів у використанні знежиреного лецитину соняшника як сировини для створення нанорозмірних контейнерів – ліпосом для транспортування фармакологічно

активних інгредієнтів і стратегію лікування хвороби Альцгеймера із врахуванням ключової ролі ліпосомальної форми флавоноїдів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Sato R, Vohra S, Yamamoto S, Suzuki K, Karpov P, Blume Y, **Shulga S**, et. al. Specific interactions between tau protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular orbital simulations. J. Mol. Graphics Model. 2020; 98: 107611. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm>. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
2. Sogawa H, Tomioka S, Shinzato T, Karpov P, **Shulga S**, Blume Ya, et. al. Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: molecular docking and *ab initio* molecular orbital calculations. Chem. Physics. 2020; 530: 1-10. doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603 (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
3. Tomioka S, Sogawa H, Shinzato T, Ishimura H, Okamoto A, Blume Y, **Shulga S**, et. al. Effect of Zn ion on the structure and electronic states of A β nonamer: molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital calculations. Mol. Simulation. 2019; 45(9): 706-715, doi: 10.1080/08927022.2019.1579328. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
4. Shinzato T, Sato R, Suzuki K, Tomioka S, Sogawa H, **Shulga S**, et. al. Proposal of therapeutic curcumin derivatives for Alzheimer's disease based on *ab initio* molecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2019; 738: 136883. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883>. (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
5. Fujimori M, Sogawa H, Ota S, Karpov P, **Shulga S**, Blume Y, et. al. Specific interactions between mycobacterial FtsZ protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2018; 692: 166-173 <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.12.045> (Особисто дисертантом запропоновано дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
6. Ishimura H, Tomioka S, Kadoya R, Shimamura K, Okamoto A, **Shulga S**, et. al. Specific interactions between amyloid- β peptides in an amyloid- β hexamer with three-fold symmetry: *Ab initio* fragment molecular orbital calculations in water. Chem. Phys. Lett. 2017; 672: 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.041> (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**
7. Ota S, Fujimori M, Ishimura H, **Shulga S**, Kurita N. Proposal for novel curcumin derivatives as potent inhibitors against Alzheimer's disease: *Ab initio* molecular simulations on the specific interactions between amyloid-beta peptide and curcumin. Chem. Phys. Lett. 2017; 685: 482-489. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.08.024>

(Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**

8. Melnyk A, Sukhoveev O, Kononets L, Khilchevsky O, **Shulga S**, Kukhar V, et al. An EPR spin probe study of liposomes from sunflower and soybean phospholipids. *J. Liposome Res.* 2016; 26(1): 80-86, DOI: 10.3109/08982104.2015.1039031. (Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, статистичний аналіз, формулювання висновків та написання статті) **Q1**

9. Tamai H, Okutsu N, Tokuyama Y, Shimizu E, Miyagi S, **Shulga S**, et al. A coarse grained molecular dynamics study on the structure and stability of small-sized liposomes. *Mol. Simulation.* 2015; 42(2): 122-130. <http://dx.doi.org/10.1080/08927022.2015.1020487> (Особисто дисертантом підготовлено дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті) **Q2**

10. Ishimura H, Kadoya R, Suzuki T, Murakawa T, **Shulga S**, Kurita N. Specific interactions between amyloid- β peptide and curcumin derivatives: *ab initio* molecular simulations. *Chem. Phys. Lett.* 2015; 633: 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.023> (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**

Статті, монографії та патенти, що додатково відображають зміст дисертації:

1. Sokolik VV, Berchenko OH, Levicheva NV, **Shulga SM**. Cytokine system reactivity of the rats' brain at intrabulbar injection of β -amyloid aggregates. *Sch. Int. J. Biochem.* 2018; 1(3): 79-84. (Особисто дисертантом проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

2. Sokolik VV, Berchenko OG, **Shulga SM**, Comparative analysis of nasal therapy with soluble and liposomal forms of curcumin on rats with Alzheimer's disease model. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism.* 2017, 7(4): 1-6. Available from: <https://www.omicsonline.org/peer-reviewed/comparative-analysis-of-nasal-therapy-with-soluble-and-liposomalrnforms-of-curcumin-on-rats-with-alzheimers-disease-model-92693.html> DOI: 10.4172/2161-0460.1000357 (Особисто дисертантом підготовлено дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті).

3. Tomioka S, Sougawa H, Ishimura H, Okamoto A, Kurita N, **Shulga S**, et. al. Molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital calculations on conformational change of amyloid- β monomers in an *in vivo* amyloid- β nonamer. *Proc. the 2017 Int. Conference on Advanced Informatics: Concepts, Theory and Application (ICAICTA2017)*, 2017, Kuta, Indonesia, p. 1-6. doi: 10.1109/ICAICTA.2017.8090992 (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

4. Ishimura H, Kadoya R, Shimamura K, Ota S, Fujimori M, Okamoto A, **Shulga S**, et. al. *Ab initio* fragment molecular orbital calculations on the specific interactions between amyloid- β peptides in an *in vivo* amyloid- β fibril. *Proc. of the 2016 Int. Conference on Advanced Informatics, Computational Science & Engineering*, 2016, Penang, Malaysia, p. 1-9. doi:10.1109/icaicta.2016.7803094 (Особисто дисертантом запропоновано дизайн

дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

5. Ota S, Ishimura H, Fujimori M, **Shulga S**, Kurita N. Ab initio molecular simulations on specific interactions between amyloid- β peptide and new curcumin derivatives. Proc. of the Int. Conference on Advanced Informatics, Computational Science & Engineering; 2016 Aug 16-19, Penang, Malaysia, p. 1-6. DOI: 10.1109/ICAICTA.2016.7803090 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

6. Sokolik VV, Karpov PA, Samofalova DA, **Shulga SM**. Anti-cytokine activity of curcumin and its binding to a fragment of A β PP. Adv. Biochem. 2016; 4(4): 34-46. doi: 10.11648/j.ab.20160404.11. (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

7. Sokolik VV, **Shulga SM**. Effect of curcumin on accumulation in mononuclear cells and secretion in incubation medium of A β (40) and cytokines under local excess of A β (42)-homoaggregates. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(3): 83-91. DOI: 10.15407/ubj88.03.083 (*Особисто дисертантом проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

8. Sokolik VV, Koliada OK, **Shulga SM**. Effect of β -amyloid peptide 42 on the dynamics of expression and formation of A β (40), IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10 by peripheral blood mononuclear cells *in vitro* and its correction by curcumin. Ukr. Biochem. J. 2016; 88(1): 109-118. DOI: 10.15407/ubj88.01.109 (*Особисто дисертантом проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

9. **Шульга СМ**. Ліпосом та жирнокислотний склад лецитину і фосфоліпідів соняшнику. Biotechnol. Acta. 2016; 9(1): 87-96. <https://doi.org/10.15407/biotech9.01.087>

10. Sokolik VV, **Shulga SM**. Influence of curcumin on cytokines content and angiotensin-converting activity under intrahippocampus administration of β -amyloid peptide in rats. Biotechnol. Acta. 2015; 8(3): 78-88. DOI: 10.15407/biotech8.03.078 (*Особисто дисертантом проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

11. Sokolik VV, **Shulga SM**. Effect of curcumin liposomal form on angiotensin converting activity, cytokines and cognitive characteristics of the rats with alzheimer's disease model. Biotechnol. Acta. 2015; 8(6): 48-55. <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.048> (*Особисто дисертантом проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

12. Дроздов ОЛ., **Шульга СМ**, Адаб М, Глух ІС. Гепатопротекторна дія біопрепаратів зі знежирених лецитинів сої та соняшника. Biotechnol. Acta. 2014; 7(1): 123-130. doi: 10.15407/biotech7.01.123 (*Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел, оформлення ілюстрацій, обговорення результатів та написання статті*).

13. **Шульга С.М.** Створення та характеристика ліпосомальної форми куркуміну / Biotechnol. Acta. 2014; 7(5): 55-61.

14. **Шульга СМ.** Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво. *Biotechnol. Acta.* 2013; 6(5): 19-40. doi: 10.15407/biotech6.05.019
15. Хробатенко ОВ, Притульська НВ, **Шульга СМ.** Створення та дослідження ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. *Biotechnol. Acta.* 2013; 6(3): 110-115. *(Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел, обговорення результатів, формулювання висновків та написання статті).*
16. **Шульга СМ,** Глух ІС, Глух АІ, Дроздов АЛ, Школа ОІ. Разработка технологии получения сухого лецитина из фосфатидного концентрата подсолнечника. *Наука та інновації.* 2012; 8 (5): 62-71. *(Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті).*
17. **Шульга СМ,** Глух ІС, Дроздов ОЛ. Біологічні властивості лецитину соняшника. *Наукові праці Одеської нац. академії харчових технологій.* 2012; 42(1): 234-238. *(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті).*

Монографії:

1. Дроздов ОЛ, Свіргун ІС, Сілкіна ЮВ, **Шульга СМ.** Нейротропний ефект лецитину. Дніпро: ЧМП «Економіка»; 2019. 172 с. *(Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділи 1 та 2.1.1 і 2.1.2).*
2. **Шульга СМ,** Микитюк ВВ, Глух ІС. Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва. Київ: Освіта України; 2010. 114 с. *(Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділи 3.1, 4 і 6).*

Патенти:

1. **Шульга СМ,** Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, винахідники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, патентовласники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну. Патент на винахід №121627. 2020 Черв 25.
2. **Шульга С М,** Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, винахідники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, патентовласники: Шульга С М, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну. Патент на корисну модель №134981. 2019 Черв 10.
3. Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, **Шульга СМ,** винахідники: Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, Шульга СМ, патентовласники: Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, Шульга СМ, Спосіб пригнічення нейрозапалення та корекції пам'яті при хворобі Альцгеймера в експерименті. Патент на корисну модель № 129295, 2018 Жовт 25.
4. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ,** Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90512. 2014 Трав 26.

5. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ**, Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90511. 2014 Трав 26.
6. Пригудзька НВ, Хробатенко ОВ, **Шульга СМ**, винахідники: Пригудзька НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ, патентовласники: Пригудзька НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ. Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування. Патент на корисну модель №77865. 2013 Лют 25.
7. **Шульга СМ**, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, винахідники; Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, патентовласники: Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №54922. 2010 Лист 26.

Тези доповідей:

1. **Шульга СМ**, Глух ІС, Гаманухо ВІ, Школа ОІ, Терещенко СІ. Создание производства пищевой и биологически активной добавки «Лецитин» из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Сборник статей научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль биологически активных пищевых добавок в обеспечении здоровья населения»; 6-7 ноября 2003 г.; Днепропетровск; 2003; с. 96-97.
2. **Шульга СМ**, Глух ІС, Гаманухо ВІ, Школа ОІ, Терещенко СІ. Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин». В: Матеріали науково-практичної конференції «Харчові добавки, інгредієнти, БАДІ: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв»; 30.06 – 4.07. 2003 р., Феодосія, АР Крим, Київ: «Знання»; 2003; с.68-70.
3. **Sergiy M Shulga**, Igor S Glukh. Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions from sunflower. In: 10th ILPS phospholipid congress; 16-18 September 2011; Rotterdam, the Netherlands. <https://orbit.dtu.dk>
4. **Шульга СМ**, Глух ІС, Иващенко ТА. Получение L- α -лецитина и липосомальных наноземulsion из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Тезисы докладов VI Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 21-25 марта 2011 г.; Москва; 2011; с. 435.
5. **Shulga S**, Glukh I. Liposomes and liposomal nanoemulsions from sunflower. In: 15th European Congress on Biotechnology; 23-26 September 2012; Istanbul, Turkey: «New biotechnology»; 2012; V. 29, Issue S, p. S127. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.08.355 **Q2**
6. **Shulga S**, Glukh I. Technology of Dry Powder Sunflower Lecithin for Food, Feed and Pharmaceuticals. In: 103rd AOCS Annual Conference & Expo; April 29-May 2, 2012; Long Beach, California, USA; 2012. file:///H:/Amie/abstracts/am2012/Phospholipid.htm
7. Shulga S, Glukh I, Drozdov O. Biological properties of deoil sunflower lecithin. In: 104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H:/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm
8. **Shulga S**, Glukh I, Danilov V. Multiscale molecular simulation and experimental investigation of sunflower phospholipids liposomes using for scavenging free radicals. In: 104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H:/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm
9. **Шульга СМ**, Глух ІС, Дроздов АЛ. Биологические свойства обезжиренного

лецитина из подсолнечника. В: Тезисы докладов VII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 19 – 22 марта 2013; Москва; 2013; с. 73.

10. **Шульга СМ**, Глух ИС, Данилов ВИ. Компьютерное моделирование и экспериментальные исследования применения липосом из фосфолипидов подсолнечника для подавления свободных радикалов. В: Тезисы докладов VII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 19 – 22 марта 2013; Москва; 2013; с. 113.

11. Мельник АК, Суховеев ОВ, Кононець ЛА, Хильчевський ОМ, **Шульга СМ**, Іващенко ТА, Трачевський ВВ, Кухар ВП, Вовк АІ. Порівняльна характеристика ліпосом з соняшникового лецитину: дослідження методом спінових зондів. В: Матеріали XXIII Української конференції з органічної хімії, присвяченої 95-річчю заснування НАН України; 16-20 вересня 2013; Чернівці; 2013; с. 248.

12. Дзяк ГВ, **Шульга СМ**, Глух ИС, Дроздов АЛ. Лецитин и эссенциальные фосфолипиды подсолнечника. Технология и применение. В: Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології»; 26-27 вересня 2013 р.; Дніпропетровськ; 2013; с. 105.

13. Дроздов ОЛ, **Шульга СМ**, Глух ИС, Глух АІ, Рудько АМ. Розробка методики отримання і способів контролю якості фосфоліпідів рослинного походження, які виявляють гіпохолестеринемічні властивості. В: Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології»; 26-27 вересня 2013 р.; Дніпропетровськ; 2013; с. 39.

14. **Шульга СМ**. Эссенциальные фосфолипиды подсолнечника. Технология и применение. В: Материалы I Международной научно-практической конференции «Химия, Био- и Нанотехнологии, Экология и Экономика в Пищевой и Косметической промышленности»; 10-13 червня 2013 р.; Щелкино, АР Крым; 2013; с.46.

15. **Shulga Sergiy M**, Danilov Victor I, Kurita Noriyuki. Molecular Computer Simulations for Liposomes Models. In: Methods and Applications of Computational Chemistry, Fifth International Symposium MACC-5; 1 - 5 July, 2013; Kharkiv, Ukraine; 2013; p. 74.

16. **Shulga SM**, Glukh IS, Danilov VI, Kurita Noriyuki. Multiscale molecular simulation and experimental investigation of sunflower phospholipids liposomes. In: Methods and Applications of Computational Chemistry, Fifth International Symposium MACC-5; 1 - 5 July, 2013; Kharkiv, Ukraine; 2013; p. 75.

17. Ратушна М, Соколік В, **Шульга С**. Вплив куркуміну на мнестичні функції щурів на експериментальній моделі хвороби альцгеймера. В: Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів; м. Львів, 20–23 квітня 2015 р.; Львів: СПОЛОМ; 2015; с. 488-49.

АНОТАЦІЯ

Шульга С.М. Створення транспортних наносистем на основі есенціальних фосфоліпідів олії соняшника для посилення біологічних ефектів куркуміну. – Кваліфікаційна наукова праця за сукупністю наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія – Державна установа «Інститут харчової біотехнології і геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

У роботі представлено комплексне дослідження з розроблення технології сухого знежиреного лецитину (суміші фосфоліпідів) з фосфатидного концентрату олії соняшника, з подальшим використанням як сировини для створення ліпосомальних форм фармацевтично активних інгредієнтів. Визначено, що ліпосоми з фосфоліпідів соняшника більш стабільні до ініційованого окиснення ніж ліпосоми з фосфоліпідів сої та яєчного жовтка. Показано, що стабільність ліпосом з фосфоліпідів соняшника обумовлена наявністю хлорогенової кислоти (0.8%) та а-токоферола (0.07%). Визначено найбільш ефективний метод створення ліпосомальної форми куркуміну – метод екструзії через мембрани з ефективністю включення куркуміна 95-98%. Запропоновано новий підхід до лікування хвороби Альцгеймера із врахуванням ключової ролі ліпосомальної форми куркуміна. Встановлено що куркумін може впливати на процес утворення А β -мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесингу попередника β -амілоїдних пептидів. Виявлено, що ряд похідних куркуміна, зокрема, 9-кето 11-енол куркумін I, мають більшу енергію зв'язку (спорідненість) з А β , ніж інші. Науково обгрунтовано можливість застосування 9-кето 11-енол куркумін I як інгібітора агрегації А β (терапевтичний ефект), яка вважається початковим етапом розвитку хвороби Альцгеймера.

Ключові слова: лецитин, фосфоліпідів соняшника, ліпосоми, куркумін, амілоїдні пептиди, хвороба Альцгеймера

SUMMARY

Shulga S.M. The creation of transport nanosystems based on essential phospholipids of sunflower oil to enhance the biological effects of curcumin. – Set of scientific articles.

The thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences in Biotechnology – 03.00.20 – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The manuscript presents a comprehensive study on the development of technology of dry deoil lecithin (mixtures of phospholipids) from phosphatide concentrate of sunflower oil, with subsequent use as a raw material for creating liposomal forms of pharmaceutically active ingredients. It was determined that liposomes from sunflower phospholipids are more stable to initiated oxidation than liposomes from soybean and egg yolk

phospholipids. It is shown that the stability of liposomes from sunflower phospholipids is due to the presence of chlorogenic acid (0.8%) and α -tocopherol (0.07%). The most effective method of creating a liposomal form of curcumin is determined - the method of extrusion through membranes with the efficiency of curcumin incorporation 95-98%. A new approach and treatment strategy for Alzheimer's disease is proposed, taking into account the key role of the liposomal form of curcumin. It has been established that curcumin can interfere with the formation of A β -monomers by interacting with the processing sites of the precursor of β -amyloid peptides. A number of curcumin derivatives, in particular 9-keto 11-enol curcumin I, have been found to have a higher binding energy (affinity) to A β than others. The possibility of using 9-keto 11-enol curcumin I as an inhibitor of A β aggregation (therapeutic effect), which is considered to be the first step in the development of Alzheimer's disease, has been scientifically substantiated. Liposomal curcumin nasal therapy with a preclinical model of Alzheimer's disease (intrahypocampal administration of A β 42 homoaggregates) has been shown to inhibit angiotensin converting activity and show greater anticytokine potential in the hippocampus in animals. The addition of curcumin removed the initiating effect of A β 42 on the mononuclear pool of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α) and restored the intracellular pool of anti-inflammatory interleukin IL-10.

Keywords: lecithin, sunflower phospholipids, liposomes, curcumin, amyloid peptides, Alzheimer's disease.

ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна хроматографія;

ІФА – імуноферментний метод аналізу;

куркумін I – куркумін (curcumin);

куркумін II – диметоксикуркумін (demethoxycurcumin);

куркумін III – бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin);

ЯМР – ядерний магнітний резонанс;

AICD – внутрішньоклітинний домен;

A β – β -амілоїдного пептиду;

A β PP – попередник β -амілоїдного пептиду;

AD – хвороба Альцгеймера;

АТФ – аденозинтрифосфат;

AFM – атомно-силова мікроскопія;

ChA – хлорагенова кислота, chlorogenic acid;

DMPC – димиристоїлгліцеро-фосфатидилхолін, dimyristoylglycerophosphatidylcholine;

DPPC – дипальмітоїл-фосфатидилхолін, dipalmitoyl-phosphatidylcholine;

EPR – електронно-парамагнітний резонанс;

FtsZ – бактеріальний білок;

GDP – гуанозиндифосфат;

GTP – гуанозинтрифосфат;

LPC – лізофосфатидилхоліна;
MD – молекулярна динаміка;
MM – молекулярна механіка;
PA – фосфатидна кислота, phosphatidic acid;
PC – фосфатидилхолін;
PE – фосфатидилетаноламін;
PG – фосфогліцерол;
PI – фосфатидилінозитол, phosphatidylinositol;
POPC – пальмітоїлолеїл-фосфатидилхолін, palmitoyloleoyl-phosphatidyl-choline;
POPE – пальмітоїлолеїл-фосфатидилетаноламін, palmitoyloleoyl-phosphatidyl-ethanolamine;
PS – фосфатидилсерин;
SDL – однакова щільність молекул фосфоліпідів у внутрішньому та зовнішньому шарах ліпосоми.
SFL – знежирений лецитин соняшника;
SNL – однакова кількість молекул фосфоліпідів, розташованих на внутрішньому і зовнішньому шарах мембрани ліпосом;
ssNMR – твердотільний ядерний магнітний резонанс;
TMD – трансмембранний домен;
Zantrin Z3 – (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine);
ZZ3 – (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine);
 α ToC – α -токоферол, α -tocopherol.