

Національна академія наук України

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Жукова Дарія Андріївна

УДК: 577.27:[591.145:616.931]

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КУРКУМІНУ, АДСОРБОВАНОГО НА
ПРОТЕЇНАХ**

091 – Біологія та Біохімія

09 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____/Д.А. ЖУКОВА/

Науковий керівник: **Колибо Денис Володимирович**, доктор біологічних
наук, професор

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Жукова Д.А. Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія і біохімія». - Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Куркумін (диферулоилметан) – це поліфенольна сполука природного походження з низкою терапевтичних властивостей, а саме антипроліферативною, проапоптотичною та протипухлинною властивостями, але низкою біодоступністю. Одним зі способів підвищення біодоступності куркуміну є його взаємодія з протеїновими носіями. Дифтерійний токсин (ДТ) є одним із найбільш вивчених природних цитотоксичних агентів зі специфічністю до асоційованого з пухлинними клітинами рецептора proHB-EGF (гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту). Використання CRM197 в якості носія для куркуміну є як способом підвищення біодоступності останнього, так і шляхом специфічності доставки куркуміну в клітини. Таким чином, дослідження утворення комплексів куркуміну з протеїновими носіями, зокрема з CRM197, є одним з перспективних підходів для створення нових препаратів з протипухлинними властивостями.

Метою роботи було одержання комплексів куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 для підвищення біодоступності та специфічної доставки куркуміну в клітини та характеристика отриманих комплексів.

Відповідно до мети було сформульовано 6 завдань:

1. Отримати комплекси куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 та охарактеризувати їх фізико-хімічні властивості;
2. Дослідити цитотоксичний вплив отриманих комплексів щодо малігнізованих клітин;
3. Оцінити дію куркуміну, протеїнових носіїв та протеїн-куркумінових комплексів щодо немалігнізованих клітин;

4. Вивчити механізми взаємодії куркуміну та його протеїнових комплексів з поверхнею малігнізованих клітин;
5. З'ясувати механізми цитотоксичного впливу отриманих комплексів на малігнізовані клітини;
6. Дослідити імуногенність протеїнових носіїв куркуміну.

Отримання комплексів куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 та характеристика їх властивостей. Дослідження *in silico* можливих сайтів з'єднання молекули куркуміну та двох досліджуваних протеїнів – CRM197 та BSA за допомогою молекулярного докінгу показало наявність щонайменше двох сайтів зв'язування в молекулі BSA та принаймні одного в молекулі CRM197. Згідно таких розрахунків, в першому сайті зв'язування куркуміну з BSA він утворює водневі зв'язки з залишками Tyr138, Tyr161 і His146. Другий сайт зв'язування куркуміну з BSA характеризувався водневими зв'язками між Ser202, Ile290 і взаємодіями молекулярних π -орбіталей (π - π зв'язком) з Trp214. Комплекс CRM197 з куркуміном стабілізується шляхом утворення водневих зв'язків із взаємодіями Lys20, Gly18 і π - π між ароматичними частинами куркуміну та His17 і Tyr61 CRM197. Спектрометричне дослідження показало, що обидва протеїни виявили здатність підвищувати розчинність куркуміну в водних буферах, що можна було зафіксувати по збільшенню поглинання на хвилі 420нм для утворених комплексів, що є характерним максимумом поглинання куркуміну. При насиченні протеїнів куркуміном подальшого збільшення ефективності поглинання не спостерігається. На основі цих даних молярне співвідношення становило 1:2,5 для BSA і куркуміну та 1:3 для CRM197 і куркуміну відповідно. Спектральна поведінка комплексів може бути доказом стехіометрії утворення комплексів куркуміну з BSA або CRM197. Отже, що більше ніж одна молекула куркуміну може взаємодіяти з однією молекулою протеїну.

Отримані комплекси характеризувалися стабільністю та підвищеною розчинністю куркуміну. Згідно моделювання *in silico* та спектрофотометричних досліджень молекула CRM197 має не менше одного

сайту з'єднання з куркуміном, а молекула BSA має щонайменше два сайти з'єднання з молекулою куркуміну.

Оцінка цитотоксичного впливу отриманих комплексів щодо малігнізованих клітин та їх безпечності для умовно нормальних клітин *in vitro*. Дослідження впливу куркуміну на малігнізовані клітини було визначено за його *індексом цитотоксичності 50% (IC_{50})* на малігнізованих клітинах лінії MDA-MB231, що показала низьку цитотоксичність вільного куркуміну. ($IC_{50}=0,012$ мг/мл).

Визначення IC_{50} демонструє безпеку використання нетоксичного рекомбінантного похідного ДТ (CRM197) та його В-фрагменту (SbB) на відміну від дифтерійного токсину для досліджуваних клітин. Для дифтерійного токсину IC_{50} становила 0,048 мкг/мл для клітин лінії MDA-MB231 і 0,018 мкг/мл для клітин лінії A431. Клітинна лінія A431 демонструвала вищу чутливість до дифтерійного токсину через вищий рівень експресії proHB-EGF як місця зв'язування з ДТ. IC_{50} для CRM197 і SbB був на два порядки вищим, ніж для ДТ для обох перевірених клітинних ліній. Це свідчить про те, що використання CRM197 і SbB є більш безпечним, ніж природного ДТ.

Нижчий рівень цитоксичності CRM197 відносно нативного ДТ не виключає впливу CRM197 на клітину шляхом формування пор в мембрані. Для перевірки даної гіпотези було проведено визначення провідності фосфатидилетаноламін-вміщуювальної бішарової ліпідної мембрани під дією різних блокаторів утворення пор – солей тіазолію з різною довжиною бічного ланцюга та вплив кон'югатів CRM197 з блокаторами на пухлинні клітини. Три найефективніші блокатори за результатами експериментів зі зниження електропровідності фосфатидилетаноламін-вміщуювальної бішарової ліпідної мембрани були обрані для тестування на культурах клітин. Результати показали підвищення життєздатності на 30% клітин, оброблених CRM197 (10^{-7} мкг/мл), під впливом блокатору на клітинах A431.

З метою визначення ефективності застосування комплексів куркуміну з протеїнами щодо малігнізованих клітин ми протестували клітинну лінію MDA-MB-231. IC_{50} комплексів куркуміну становила 0,0015 мг/мл для CRM197 і 0,0008 мкг/мл для SbB щодо клітин MDA-MB-231. Це свідчить про те, що комплекси протеїнів з куркуміном можуть бути ефективними засобами доставки для покращення специфічності доставки та підвищення біодоступності куркуміну для малігнізованих клітин.

Життєздатність клітин MDA-MB-231, оброблених комплексами куркумін-BSA та куркумін-SbB, зменшується в 1,5 рази порівняно з впливом вільного куркуміну. Комплекс SbB з куркуміном знижував життєздатність MDA-MB-231 і A431 клітин на 49% і 71% відповідно. Малігнізовані суспензійні клітини Jurkat та немалігнізовані клітини 4BL продемонстрували відсутність чутливості до всіх протестованих комплексів ймовірно за рахунок низького рівня експресії proHB-EGF на їх поверхні.

Утворення комплексів куркуміну з нетоксичними похідними дифтерійного токсину значно підвищило біодоступність куркуміну щодо малігнізованих клітин. IC_{50} для комплексів куркуміну з CRM197 та SbB і становили 4,2мкМ та 2,2мкМ відповідно.

Дослідження взаємодії отриманих комплексів з клітинами та визначення механізмів їх цитотоксичного впливу на малігнізовані клітини.

За допомогою протокової цитофлуориметрії було продемонстроване збільшення ефективності взаємодії з поверхнею клітин флуоресціюючого куркуміну принаймні в 6 і 10 разів для комплексів BSA з куркуміном та SbB з куркуміном відносно вільного куркуміну для клітин A431. Для клітиної лінії MDA-MB-231 рівень взаємодії з комплексами збільшувався в 5 та 7 разів для BSA з та SbB відповідно.

Дослідження часу інтерналізації куркуміну клітинами A431 показало, що вільний куркумін потрапляє в середину клітин впродовж 15 хвилин, тоді як комплекси куркуміну з протеїновими носіями стають повністю інтерналізованими впродовж 90 хвилин. Сповільнене транспортування

протеїново-куркумінового комплексу до клітини можна пояснити взаємодією SbB і CRM197 з proHB-EGF, що, ймовірно, приводить до їх затримки на клітинній поверхні.

Визначення рівня куркумін-індукованого апоптозу показало, що використання комплексів BSA-куркумін або SbB-куркумін підвищило рівень загибелі клітин A431 у 3,14 та 4,97 разів відповідно, тоді як життєздатність клітин MDA-MB-231 знизилася в 2 рази порівняно з контролем для обох використаних білкових носіїв. Отже, ефективність апоптозу зумовлена в першу чергу молекулою куркуміну, тоді як BSA та SbB виконують роль переносників.

Було показано, що вплив куркуміну та його комплексів викликав загибель клітин в першу чергу апоптозом, тоді як вміст некротичних клітин був на рівні контролю.

Аналіз вмісту основних сигнальних протеїнів показав статистично достовірне зниження фосфорильованої форми EGFR, що призводить до збільшення ймовірності переходу малігнізованих клітин до апоптичного шляху через зниження рівня активації Akt-1.

Дослідження імуногенності окремих субодиниць нетоксичного рекомбінантного дифтерійного токсину. Оцінку імуногенності рекомбінантних протеїнів проводили для визначення можливості їх використання при створенні на їх основі лікарських засобів, в тому числі комплексів з куркуміном. Найсильніші імуногенні властивості характерні для CRM197, тоді як SbB проявив нижчий рівень імуногенності, що є підґрунтям для використання саме В-субодиниці як носія куркуміну, оскільки він не буде викликати активної імунної відповіді та є більш безпечним при використанні *in vivo*.

Таким чином, в ході дисертаційної роботи було створено комплекси куркуміну з протеїнами BSA, CRM197 та його В-фрагментом, досліджено та проаналізовано їх фізико-хімічні властивості та вплив на малігнізовані та немалігнізовані клітини, що дозволило створити підходи до підвищення

біодоступності та специфічності доставки куркуміну до пухлинних клітин. Отримані результати дозволили зробити наступні висновки:

1. Куркумін утворює стійкі комплекси з BSA та CRM197 за рахунок існування щонайменше двох сайтів з'єднання з молекулою BSA та з молекулою CRM197;
2. Рівень цитотоксичності та антипроліферативної активності куркумін-протеїнових комплексів був більше ніж на порядок вищим відносно вільного куркуміну;
3. Протеїн-куркумінові комплекси не проявляють вираженого цитотоксичного впливу щодо немалігнізованих клітин;
4. Біодоступність куркуміну у складі комплексів з куркуміном збільшується за рахунок підвищення розчинності, тоді як специфічність доставки куркуміну до малігнізованих клітин у складі комплексів з нетоксичним рекомбінантним похідним дифтерійного токсину збільшується за рахунок взаємодії з рецептором pro-HB-EGF на цих клітинах, що було визначено за збільшенням ефективності взаємодії куркуміну з поверхнею клітин та за рівнем інтерналізації комплексів;
5. Переважаючим шляхом загибелі малігнізованих клітин під дією куркумін-протеїнових комплексів був апоптоз;
6. Імуногенність нетоксичних похідних дифтерійного токсину зменшуються з їх розміром, що дозволяє пропонувати меншу субодиницю SbV в якості носія куркуміну при створенні комерційних препаратів.

В роботі вперше отримано та охарактеризовано комплекси куркуміну з дифтерійним токсином CRM197 та його B-фрагментом та продемонстровано вищий рівень пригнічення клітинних ліній A431 та MDA-MB-231 отриманими комплексами у порівнянні з комплексом куркуміну з BSA, вільним куркуміном та вільним CRM197 або його B-фрагментом. Доведена стабільність комплексів у водних середовищах та ефективність впливу на

малігнізовані клітини робить їх перспективною базою для створення нових терапевтичних препаратів.

За матеріалами дисертації опубліковано 3 роботи (еквівалентні 5 роботам згідно Положення про Порядок проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 року № 167), з них 2 статті у міжнародних виданнях першого квартилю Q1, що входять до міжнародної бази даних SCOPUS, та 1 стаття у вітчизняному виданні, що належить до фахових видань, визнаних МОН України; 2 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Ключові слова: куркумін, пухлинні захворювання, протипухлинна дія, цитотоксичний вплив, клітинний сигналінг, малігнізовані клітини, рак грудної залози, протеїнові носії, протеїни крові, молекулярний докінг, хроматографія, специфічна доставка, наноконплекси, полімерні носії, апоптоз.

ABSTRACT

Zhukova D.A. Biological properties of curcumin adsorbed on proteins. - Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 "Biology and Biochemistry" - Institute of Biochemistry named after O.V. Palladina of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

Curcumin (diferuloylmethane) is a natural polyphenolic compound origin with a number of therapeutic properties, namely antiproliferative, proapoptotic and antitumor properties, but low bioavailability. One of the ways to increase bioavailability of curcumin is its interaction with protein carriers. Diphtheria toxin (DT) is one of the most studied natural cytotoxic agents with specificity for the proHB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) receptor associated with tumor cells. The use of CRM 197 as a carrier for curcumin is both a way to increase the bioavailability of the latter and a way to specifically deliver curcumin to cells. Thus, the study of the formation of complexes of curcumin with protein carriers, in particular with CRM 197, is one of the promising approaches for the creation of new drugs with antitumor properties.

To achieve the goal, the following tasks were set:

1. Obtain curcumin complexes with BSA and CRM 197 proteins and characterize their physical and chemical properties;
2. Investigate the cytotoxic effect of the obtained complexes on malignant cells;
3. To assess the effect of curcumin, protein carriers and protein-curcumin complexes on non-malignant cells;
4. To study the mechanisms of interaction of curcumin and its protein complexes with the surface of malignant cells;
5. Determine the mechanisms of the cytotoxic effect of the obtained complexes on malignant cells;
6. To investigate the immunogenicity of curcumin protein carriers.

Preparation of curcumin complexes with BSA and CRM197 proteins and characterization of their properties. Research in *in silico* of the possible binding sites of the curcumin molecule and the two investigated proteins - CRM197 and BSA using molecular docking showed the presence of at least two binding sites in the BSA molecule and at least one in the CRM197 molecule. According to such calculations, in the first binding site of curcumin with BSA, it forms hydrogen bonds with residues Tyr138, Tyr161 and His146. The second binding site of curcumin with BSA was characterized by hydrogen bonds between Ser202, Ile290 and interactions of molecular π -orbitals (Pi-Pi bond) with Trp214. The complex of CRM197 with curcumin is stabilized by the formation of hydrogen bonds with Lys20, Gly18 and Pi-Pi interactions between the aromatic moieties of curcumin and His17 and Tyr61 of CRM197. A spectrometric study showed that both proteins showed the ability to increase the solubility of curcumin in aqueous buffers, which could be recorded by increasing the absorption at 420 nm for the formed complexes, which is the characteristic maximum of curcumin absorption. When proteins are saturated with curcumin, no further increase in absorption efficiency is observed. Based on these data, the molar ratio was 1:2.5 for BSA and curcumin and 1:3 for CRM197 and curcumin, respectively. The spectral behavior of the complexes may be evidence of the stoichiometry of curcumin complex formation with BSA or CRM197. So more than one curcumin molecule can interact with one protein molecule.

The obtained complexes were characterized by stability and increased solubility of curcumin. According to modeling in *in silico* and spectrophotometric studies, the CRM197 molecule has at least one curcumin binding site, and the BSA molecule has at least two curcumin binding sites.

Assessment of the cytotoxic effect of the obtained complexes on malignant cells and their safety for conditionally normal cells in vitro. The study of the effect of curcumin on malignant cells was determined by its *cytotoxicity index of 50% (IC₅₀)* on malignant cells of the MDA-MB231 line, which showed a low cytotoxicity of free curcumin. ($IC_{50}=0.012$ mg/ml).

Determination of IC_{50} demonstrates the safety of using a non-toxic recombinant DT derivative (CRM 197) and its B-fragment (SbB) in contrast to diphtheria toxin for the tested cells. For diphtheria toxin IC_{50} was 0.048 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for MDA-MB231 cells and 0.018 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for A431 cells. Cell line A431 showed a higher sensitivity to diphtheria toxin due to a higher level of expression of proHB-EGF as a binding site for DT. The IC_{50} for CRM197 and SbB was two orders of magnitude higher than for DT for both cell lines tested. This suggests that the use of CRM197 and SbB is safer than natural DT.

The lower level of cytotoxicity of CRM197 relative to native DT does not exclude the effect of CRM 197 on the cell by forming pores in the membrane. To test this hypothesis , the phosphatidylethanolamine-containing conductivity was determined bilayer lipid membrane under the action of various blockers of pore formation - thiazolium salts with different side chain lengths and the effect of conjugates CRM 197 with tumor cell blockers. The three most effective blockers according to the results of experiments on reducing the electrical conductivity of phosphatidylethanolamine-containing bilayer lipid membrane were chosen for testing in cell cultures. The results showed a 30% increase in viability of cells treated with CRM197 ($10^{-7} \mu\text{g}/\text{ml}$) under the influence of the blocker on A431 cells.

In order to determine the effectiveness of curcumin complexes with proteins against malignant cells, we tested the MDA-MB-231 cell line. The IC_{50} of the curcumin complexes was 0.0015 mg/ml for CRM197 and 0.0008 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for SbB against MDA-MB-231 cells. This suggests that protein complexes with curcumin may be effective delivery vehicles to improve delivery specificity and increase bioavailability curcumin for malignant cells.

The viability of MDA-MB-231 cells treated with curcumin -BSA and curcumin-SbB complexes is reduced by 1.5 times compared to exposure to free curcumin . The complex of SbB with curcumin reduced the viability of MDA-MB-231 and A431 cells by 49% and 71%, respectively. Malignant Jurkat suspension cells and non-malignant 4BL cells showed a lack of sensitivity to all tested complexes probably due to low expression levels proHB-EGF on their surface.

The formation of complexes of curcumin with non-toxic derivatives of diphtheria toxin significantly increased bioavailability of curcumin against malignant cells. IS_{50} for curcumin complexes with CRM197 and SbB and were 4.2 μ M and 2.2 μ M, respectively.

Study of the interaction of the obtained complexes with cells and determination of the mechanisms of their cytotoxic effect on malignant cells. With the help of duct cytofluorimetry showed an increase in the efficiency of the interaction with the cell surface of fluorescent curcumin by at least 6 and 10 times for the complexes of BSA with curcumin and SbB with curcumin relative to free curcumin for A431 cells. For the MDA-MB-231 cell line, the level of interaction with the complexes increased by 5 and 7 times for BSA with and SbB , respectively.

internalization time of curcumin by A431 cells showed that free curcumin enters the cell interior within 15 minutes, while complexes of curcumin with carrier proteins become fully internalized within 90 minutes. The delayed transport of the protein-curcumin complex into the cell can be explained by the interaction of SbB and CRM197 with pro HB-EGF, which probably leads to their retention on the cell surface.

Determination of the level of curcumin -induced apoptosis showed that the use of BSA- curcumin or SbB-curcumin complexes increased the level of A431 cell death by 3.14 and 4.97-fold, respectively, while the viability of MDA-MB-231 cells decreased by 2-fold compared to the control for both protein carriers used. Therefore, the efficiency of apoptosis is determined primarily by the curcumin molecule , while BSA and SbB play the role of carriers.

It was shown that exposure to curcumin and its complexes caused cell death primarily by apoptosis , while the content of necrotic cells was at the control level.

Analysis of the content of the main signaling proteins showed a statistically significant decrease in the phosphorylated form of EGFR , which leads to an increase in the probability of the transition of malignant cells to the apoptotic pathway due to a decrease in the level of Akt-1 activation.

Study of immunogenicity of individual subunits of non-toxic recombinant diphtheria toxin. The evaluation of the immunogenicity of recombinant proteins was carried out to determine the possibility of their use in the creation of medicinal products based on them, including complexes with curcumin. The strongest immunogenic properties are characteristic of CRM197, while SbB showed a lower level of immunogenicity, which is the basis for the use of the B-subunit as a carrier of curcumin, since it will not cause an active immune response and is safer when used *in vivo*.

Thus, in the course of the dissertation, complexes of curcumin with proteins BSA, CRM197 and its B-fragment were created, their physicochemical properties and effects on malignant and non-malignant cells were investigated and analyzed, which made it possible to create approaches to increase the bioavailability and specificity of curcumin delivery to tumor cells. The obtained results allow us to draw the following conclusions:

1. Curcumin forms stable complexes with BSA and CRM197 due to the existence of at least two connection sites with the BSA molecule and with the CRM197 molecule;
2. The level of cytotoxicity and antiproliferative activity of curcumin -protein complexes was more than an order of magnitude higher than that of free curcumin ;
3. Protein- curcumin complexes do not have a pronounced cytotoxic effect on non-malignant cells;
4. Bioavailability of curcumin as part of complexes with curcumin increases due to increased solubility, while the specificity of curcumin delivery to malignant cells as part of complexes with a non-toxic recombinant derivative of diphtheria toxin increases due to interaction with the pro - HB - EGF receptor on these cells, which was determined by increasing the efficiency interactions of curcumin with the surface of cells and the level of internalization of complexes;

5. Apoptosis was the predominant way of death of malignant cells under the influence of curcumin -protein complexes ;
6. The immunogenicity of non-toxic derivatives of diphtheria toxin decreases with their size, which allows offering a smaller subunit SbB as a carrier of curcumin in the creation of commercial preparations.

In the work, for the first time, complexes of curcumin with diphtheria toxoid CRM197 and its B-fragment were obtained and characterized, and a higher level of inhibition of A431 and MDA-MB-231 cell lines was demonstrated by the obtained complexes in comparison with the complex of curcumin with BSA , free curcumin and free CRM197 or its B- a fragment. The proven stability of the complexes in aqueous environments and the effectiveness of the effect on malignant cells make them a promising basis for the creation of new therapeutic drugs.

Based on the dissertation materials, 3 works were published (equivalent to 5 works according to the Regulation on the Procedure for Conducting an Experiment for Awarding the Doctor of Philosophy Degree, approved by Resolution No. 167 of the Cabinet of Ministers of Ukraine dated March 6, 2019), including 2 articles in international publications of the first quartile Q 1 included in the SCOPUS international database, and 1 article in a domestic publication belonging to professional publications recognized by the Ministry of Education and Science of Ukraine; 2 theses in materials of international and domestic congresses and conferences.

Key words: curcumin , tumor diseases, antitumor effect, cytotoxic effect, cell signaling , malignant cells, breast cancer, protein carriers, blood proteins, molecular docking, chromatography, specific delivery, nanocomplexes, polymeric carriers, apoptosis.

СПИСОК

Публікацій за темою дисертації

Жукової Дарії Андріївни

1. Dariia Zhukova, Daryna Katashynska, Andrii Siromolot, Svitlana Romaniuk, Denys Kolybo, Serhiy Komisarenko. Nontoxic diphtheria toxin derivatives CRM197 and B-fragment can serve as the means for targeted curcumin delivery into sensitive cancer cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology. Volume 96, 2024, 105673, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105673>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224724003423>)
2. Zhukova D.A., Hrabovskyi O.O. Complexation of curcumin with bovine serum albumin and diphtheria toxoid CRM197. Biothechnologia Acta T. 16, No. 6, 2023, p. 62-67. doi.org/10.15407/biotech16.06.076. https://biotechnology.kiev.ua/images/BTA/2023/6_2023/Atamanchuk6_2023.pdf
Zhukova D.A. – проведення спектрофотометричних досліджень, написання тексту статті;
Hrabovskyi O.O. – проведення молекулярного докінгу
3. Shatursky OY, Manoilo KY, Gorbatiuk OB, Usenko MO, Zhukova DA, Vovk AI, Kobzar OL, Triakash IO, Borisova TA, Kolibo DV, Komisarenko SV. The geometry of diphtheria toxoid CRM197 channel assessed by thiazolium salts and nonelectrolytes. Biophys J. 2021 Jun 15;120(12):2577-2591. doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.028. Epub 2021 May 1. PMID: 33940022; PMCID: PMC8390859.
4. Каташинська Д.О., Жукова Д.А., Манойлов К.Ю., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Нековалентні комплекси куркуміну з рекомбінантними похідними дифтерійного токсину як засоби доставки куркуміну в клітини. Український біохімічний конгрес 30 вересня-4

жовтня 2019. Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського.

5. Каташинська Д., Манойлов К., Жукова Д., Колибо Д., Комісаренко С. Рекомбінантна субодиниця В дифтерійного токсину як засіб доставки куркуміну в ракові клітини. Біологічний факультет Львівського національного університету. квітень 9, 2019 – квітень 11, 2019

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ABSTRACT	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	21
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	28
1.1. Властивості молекули куркуміну	28
1.1.1. Будова молекули куркуміну	28
1.1.2. Способи отримання куркуміну.....	31
1.1.3. Фізико-хімічні властивості куркуміну	35
1.2 Біологічні властивості куркуміну	38
1.2.1. Механізми дії куркуміну	38
1.2.2. Вплив куркуміну на живі організми	41
1.3. Способи підвищення біодоступності куркуміну	48
1.3.1. Низька біодоступність куркуміну	48
1.3.2. Використання везикулярних транспортних систем	49
1.3.3. Комплексоутворення куркуміну з протейновими наночастинками	53
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	58
2.1. Матеріали та обладнання	58
2.1.1. Реактиви.....	58
2.1.2. Обладнання.....	59
2.1.3. Лабораторні тварини, культури клітин еукаріот, експресійні штами бактерій та вектори, що були використані у дослідженні	59
2.1.4. Програмне забезпечення	60
2.2. Методи	61
2.2.1. Дослідження потенційних сайтів сорбції куркуміну з протейнами <i>in silico</i>	61
2.2.2. Експресія рекомбінантних похідних дифтерійного токсину в прокаріотичній системі експресії <i>E.coli</i>	61

2.2.3. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метало-афінної хроматографії на Ni-NTA-агарозі та їх аналіз.....	62
2.2.4. Отримання комплексів куркуміну з протеїнами	63
2.2.5. Характеристика отриманих комплексів за зміною спектру поглинання.....	63
2.2.6. Культивування культур клітин	63
2.2.7. Аналіз життєздатності клітин за допомогою MTT тесту	64
2.2.8. Визначення ефективності взаємодії з поверхнею клітин ссавців куркуміну та його протеїнових комплексів	65
2.2.9. Дослідження шляху загибелі клітин з використанням набору Анексин V та пропідій йодиду.....	66
2.2.10. Дослідження інтерналізації куркуміну малігнізованими клітинами	67
2.2.11. Імунізація мишей фрагментами нетоксичного похідного ДТ та забір сироваток	68
2.2.12. Визначення рівня антитіл до нетоксичних рекомбінантних похідних ДТ в сироватці крові імунізованих мишей методом ELISA	68
2.2.13. Визначення вмісту сигнальних протеїнів та їх активності методом ELISA.....	69
2.2.14. Аналіз пороутворювальних властивостей протеїнів	70
2.2.15. Статистична обробка отриманих результатів	71
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	72
3.1. Одержання комплексів куркуміну з нетоксичними рекомбінантними похідними дифтерійного токсину та їх характеристика.....	72
3.1.1 Характеристика сайтів сорбції куркуміну з похідними дифтерійного токсину.....	72
3.1.2. Аналіз чистоти отриманих препаратів нетоксичних рекомбінантних похідних дифтерійного токсину.	75

3.1.3 Дослідження спектру поглинання отриманих комплексів як характеристика ефективності їх утворення.....	77
3.1.5 Висновки до розділу	80
3.2. Біологічні властивості куркумін - протейнових комплексів щодо малігнізованих та немалігнізованих клітин	81
3.2.1. Визначення напівтоксичної дози (IC_{50}).....	81
3.2.2. Дослідження пороутворювальних властивостей рекомбінантних похідних ДТ як носіїв куркуміну.	86
3.2.3. Визначення напівтоксичної дози (IC_{50}) куркуміну, адсорбованого на нетоксичних похідних дифтерійного токсину.....	91
3.2.4. Вплив куркуміну та його комплексів на різні типи малігнізованих та немалігнізованих клітин.....	92
3.2.5. Імуногенність окремих функціональних доменів та субодиниць нетоксичного рекомбінантного дифтерійного токсину.....	95
3.2.6. Висновки до розділу	99
3.3 Механізми впливу куркуміну на малігнізовані клітини	101
3.3.1. Визначення впливу протейнових носіїв на ефективність взаємодії куркуміну з поверхнею клітин ссавців	101
3.3.2 Вплив рекомбінантних похідних дифтерійного токсину на внутрішньоклітинну акумуляцію куркуміну клітинами ссавців.....	102
3.3.3 Дослідження здатності куркуміну та його комплексів з протейнами індукувати апоптоз	103
3.3.4 Порівняльний аналіз здатності куркуміну та його комплексів з протейнами індукувати некроз	105
3.3.5. Вплив куркуміну та його компоексів з протейнами на основні шляхи сигнальної трансдукції	106
3.3.6. Висновки до розділу	110
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ .	111
ВИСНОВКИ	120
ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА.....	122

ДОДАТОК 1	155
-----------------	-----

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

BSA – бичачий сироватковий альбумін;
EDTA – етилендіамін-тетраацетат;
EGFP – підсилений зелений флуоресцентний протеїн;
FITC – флуоресцеїнізотіоціанат;
HEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота;
IC50 – напівлетальна доза;
IPTG – ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид;
PBS – фосфатний буферний розчин
PI – пропідій йодид;
RDT – рецепторний домен дифтерійного токсину
SbA – субодиниця В дифтерійного токсину
SbB – субодиниця В дифтерійного токсину;
БЛМ - фосфатидилетаноламін-вміщувальна бішарова мембрана;
ДТ – дифтерійний токсин;
ЗФР – фосфатний буферний розчин;
МТТ – 3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід;
ПААГ – поліакриламідний гель;
CRM197 – нетоксичний мутант дифтерійного токсину.

ВСТУП

Актуальність теми. Куркумін (диферулоилметан) – поліфенольна сполука природного походження, екстрагована з кореневищ рослини *Curcuma longa*, що є біс- α,β -ненасиченим β -дикетоном [108]. На сьогодні встановлено, що куркумін є фітохімічним агентом із широким спектром терапевтичної дії: нейропротекторною [155], антипроліферативною [250], проапоптотичною [132], протипухлинною [142] та протизапальною [175], що можуть знайти своє застосування у медичній практиці [269]. Неполарна частина молекули куркуміну спричинює низьку розчинність у воді, що є однією з причин низької біодоступності куркуміну в організмі людини. Окрім низького рівня розчинності швидкий катаболізм куркуміну [248] обмежує його широке терапевтичне застосування.

Існує низка перспективних способів підвищення біодоступності куркуміну включаючи хімічні модифікації [76], везикулярні системи доставки на основі наночастинок [78], екзосоми [163] або міцели [79], а також комплекси з протеїнами та іншими біомолекулами [237]. Серед перерахованих способів носії на основі протеїнів для адресної доставки куркуміну до пухлинних клітин становлять практичний інтерес через можливість використання природних поліпептидних лігандів до рецепторів з підвищеним рівнем експресії на поверхні пухлинних клітин. Дифтерійний токсин (ДТ) є одним із найбільш вивчених природних цитотоксичних агентів зі специфічністю до асоційованого з пухлинними клітинами рецептора proHB-EGF (Heparin Binding EGF-like growth factor, гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту) [81, 161], який на сьогодні вважають перспективним онкомаркером [157] і розглядають як потенційну мішень для доставки хіміопрепаратів в пухлинні клітини. Специфічне зв'язування з proHB-EGF притаманне також природному мутанту ДТ, що позбавлений каталітичної активності, CRM197 (Cross-Reactive Materials 197, перехресно-реактивні матеріали 197).

HB-EGF бере участь у прискоренні та прогресуванні пухлинного росту, метастазуванні та ангіогенезі [144, 172], що може бути пов'язаним з високим рівнем експресії proHB-EGF, притаманним для низки пухлинних клітин людини [213], до яких належать клітини епідермоїдної карциноми лінії A431 [222] та аденокарциноми грудної залози лінії MDA-MB-231 [67]. Специфічне пригнічення активності розчинної форми HB-EGF за допомогою моноклональних антитіл або дифтерійного токсоду, наприклад, CRM197, широко вивчається як перспективний спосіб лікування деяких типів пухлинних захворювань людини, який все ще має низьку ефективність через недостатню цитотоксичну активність щодо малігнізованих клітин *in vivo* [27]. З іншого боку, терапевтичне використання природного бактерійного ДТ обмежене його високою загальною токсичністю для організму людини, тому доцільно використовувати менш токсичні похідні ДТ, такі як імунотоксини, токсоди та анатоксини, як агенти для специфічної доставки протипухлинних препаратів, в тому числі і куркуміну.

Існує кілька нетоксичних похідних дифтерійного токсину, що представляють практичний інтерес. Дефектний за ADP-рибозилтрансферазною активністю гомолог дифтерійного токсину, CRM197 (через заміну Glu в положенні 52 на Gly) широко використовується в медичній практиці як протеїн-носій для виробництва кон'югованих вакцин [27] та цільової доставки хіміопрепаратів [41]. Нами було показано, що нативний ДТ, CRM197 та його рекомбінантний В-фрагмент SbB (subunit B) зв'язуються з клітинною мембраною з подальшим формуванням пори для транслокації каталітичного домену всередину клітини, що саме по собі не супроводжується значною цитотоксичністю [203]. Нами показано, що CRM197 має принаймні один сайт сорбції з куркуміном, розташований на укороченому рецептор-зв'язувальному домені ДТ [272], що робить доцільним використання як цілої молекули CRM197, так і її субодиниць, які містять рецепторний домен, зокрема SbB. Таким чином, утворення комплексів куркуміну з протеїновими

носіями може бути одним з ефективних підходів для збільшення біодоступності куркуміну.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було одержання комплексів куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 для підвищення біодоступності та специфічної доставки куркуміну в клітини та характеристика отриманих комплексів.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати комплекси куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 та охарактеризувати їх фізико-хімічні властивості;
2. Дослідити цитотоксичний вплив отриманих комплексів щодо малігнізованих клітин;
3. Оцінити дію куркуміну, протеїнових носіїв та протеїн-куркумінових комплексів щодо немалігнізованих клітин;
4. Вивчити механізми взаємодії куркуміну та його протеїнових комплексів з поверхнею малігнізованих клітин;
5. Визначити механізми впливу отриманих комплексів на малігнізовані клітини;
6. Дослідити імуногенність протеїнових носіїв куркуміну.

Об'єкт дослідження: розробка підходів до підвищення біодоступності куркуміну та посилення його протипухлинних ефектів.

Предмет дослідження: протипухлинні ефекти комплексів куркуміну з бичачим сироватковим альбуміном та нетоксичним похідним дифтерійного токсину CRM197.

Методи дослідження: для виконання поставлених завдань було використано гель-електрофорез для розділення протеїнів, метало-афінну хроматографію для очищення рекомбінантних протеїнів, мікробіологічні методи(культивування мікроорганізмів з метою нарощування біомаси для виділення рекомбінантних протеїнів), оптичні (спектрофотометрія, протокова цитометрія, конфокальна мікроскопія), препаративні методи (отримання

комплексів куркуміну з протеїнами), методи роботи із культурами евкаріотичних клітин, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

В роботі вперше було отримано та охарактеризовано комплекси куркуміну з нетоксичним похідним дифтерійного токсину CRM197 та його В-фрагментом та продемонстровано вищий рівень пригнічення життєздатності малігнізованих клітин ліній A431 та MDA-MB-231 отриманими наноконкомплексами у порівнянні з комплексом куркуміну з BSA, вільним куркуміном та вільним CRM197 або його В-фрагментом.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно були підібрано та проаналізовано джерел літератури а стосовно теми дисертаційної роботи, здійснено їх аналіз. Автор отримано наноконкомплекси куркуміну з протеїнами, досліджено їх спектрофотометричні та біологічні властивості зокрема вплив наноконкомплексів на малігнізовані клітини (здатність до кригнічення виживання індукування процесів апоптозу та некрозу), нароблено й очищено рекомбінантні антигени, проведено імунізацію лабораторних тварин з метою оцінки імуногенності рекомбінантних протеїнових носіїв. Окрім того автором проведено статистичну обробку отриманих результатів.

Автор щиро вдячний усім співробітникам лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Зокрема, науковому керівнику д.б.н., проф Д.В. Колибо, н.с., к.б.н. Криніній О.І. та н.с., к.б.н. Сіромолоту А.А. за консультації у роботі при використанні метало-афінної хроматографії та протокової цитофлуориметрії, н.с., к.б.н. Манойлову К.Ю. за консультації у роботі з прокаріотичними та евкаріотичними клітинами.

Окрім того, автор щиро вдячний д.б.н. Шатурському О.Я. за допомогу у дослідженнях взаємодії похідних ДТ з мембранами та механізмів пороутворення. Також автор висловлює подяку м.н.с. відділу структури та функцій протеїна Грабовському О.О. за допомогу у проведенні молекулярного докінгу.

Практичне значення одержаних результатів. Створення наноконкомплексів куркуміну з протеїновими носіями дозволяє поєднати застосування антиоксиданту природного походження з широким спектром біологічної активності з адресною доставкою його до пухлинних клітин за рахунок високої афінності протеїнового носія до рецепторів, що мають підвищену експресію на поверхні пухлинних клітин. У роботі досліджувалося два принципово різних типи протеїнових носіїв – BSA та CRM197 (та його субодиниця SbB). BSA використовувався як метод неспецифічної доставки куркуміну в клітини. Нетоксичне похідне дифтерійного токсину CRM197 та його В-фрагмент за рахунок своєї специфічності до рецептору proHB-EGF використовувалися як засоби специфічної доставки куркуміну в клітини з надекспресією цього рецептору. У роботі було доведено стабільність комплексів у водних середовищах та ефективність впливу на малігнізовані клітини. Отже, запропоновані похідні ДТ можуть бути використані для подальших досліджень можливості їх використання у медичній практиці як засобів специфічної доставки лікарських засобів до пухлинних клітин. З іншого боку, комплекси куркуміну з похідними ДТ, що володіють широким спектром протипухлинної активності, мають перспективи знайти застосування як фармацевтичні препарати для комплексної терапії онкологічних захворювань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках виконання базової НДР фундаментальних досліджень НАН України за темою «Визначення рецепторів, залучених до регуляції імунобіологічних функцій організму» (№ д/р 0119U002511, 2019-2023 рр.). Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, протокол № 5 від 12 червня 2024 року.

Апробація результатів дисертації. Основні результати наукових досліджень проводилися в межах національних та міжнародних конференцій: «ХІІ Український біохімічний конгрес», вересень 30 - жовтень 4, 2019

(Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського), «Молодь та поступ до біології», Біологічний факультет Львівського національного університету 9 –11 квітня, 2019.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 3 роботи (еквівалентні 5 роботам згідно Положення про Порядок проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 року № 167), з них 2 статті у міжнародних виданнях першого квартилю Q1, що входять до міжнародної бази даних SCOPUS, та 1 стаття у вітчизняному виданні, що належить до фахових видань, визнаних МОН України; 2 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів результатів дослідження та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел літератури. Робота викладена на 157 сторінках комп'ютерного набору, ілюстрована 1 таблицею та 32 рисунками. Перелік використаних джерел літератури включає 272 найменувань, з них усі латиницею.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Властивості молекули куркуміну

1.1.1. Будова молекули куркуміну

Куркума – інгредієнт з багаторічною історією, що використовувався як дієтична трав'яна добавка ще в Стародавньому Китаї та Індії [Tønnesen, 1987]. Цю унікальну спецію жовтого кольору отримують з кореневища рослини *Curcuma longa*, що входить до сімейства *Zingiberaceae*, представники поширені в Індії та інших країнах Південно-Східній Азії. Первинний активний компонент, що відповідає за жовтий колір, був виявлений та виділений на початку 90-х рр і отримав назву куркумін. У традиційній медицині куркума з давніх часів використовується для посилення імунної системи і як препарат від різноманітних респіраторних захворювань, зокрема таких як астма та алергія. Окрім того куркумін у складі куркуми проявляє активність у лікуванні діабету, кашлю, синуситу, грипу, ревматизму і функціональних порушеннях печінки [16, 66, 261]. Широкий спектр біологічних властивостей, дешева сировина та простий спосіб екстрагування зумовлюють використання куркуміну як засобу традиційної медицини і на сьогоднішній день. Численні дослідження показали, що куркумін має надзвичайно широкий спектр корисних властивостей, включаючи протизапальну, антиоксидантну, хіміопрофілактичну та хіміотерапевтичну активності, які можуть бути використані у сучасній терапії [73, 177, 254]. Ці дії були продемонстровані як на рівні ліній клітин у культурі, так і на тваринних моделях, що і лягло в основу проведення клінічних випробувань на людях.

Куркумін є основним вторинним метаболітом *C. longa*, що становить до 15% від його сухої ваги. Куркумін за своєю хімічною природою (диферулоїлметан; 1,7-біс(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-1,6-гептадієн-3,5-діон) є поліфенолом з молекулярною вагою 368,38 о.а.м. Його вміст складає 77% від куркуміноїдів, отриманих із кореневища *Curcuma longa* Linn. Молекула куркуміну має три основні функціональні групи: α , β -ненасиченої β -дикетонної та двох ароматичних О-метокси-фенольних груп (рис. 1.1)

Ароматичні кільця, які є фенолами, з'єднані двома α , β -ненасиченими карбонільними групами. Дикетони утворюють стабільні еноли і легко депротонуються з утворенням енолатів [70, 174] Характерні екстракти *C. longa* містять структури трьох ізоформ куркуміну (I – III), з яких ізоформа I є найбільш поширеною. Незважаючи на найбільшу поширеність саме першої ізоформи (безпосередньо куркуміну), деякі вчені стверджують про потужніші антиоксидантні та протипухлинні властивості третьої ізоформи (біс-диметоксикуркумін) [70]. Оскільки перша ізоформа домінує у складі куркуміноїдів та проявляє широкий спектр біологічної активності, то надалі теоретична та експериментальна частини роботи будуть присвячені саме цій ізоформі.

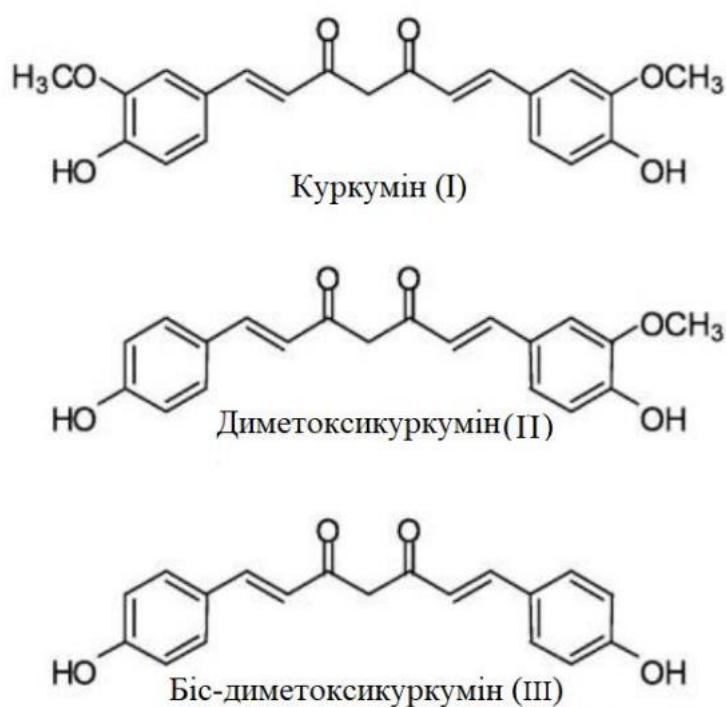


Рис. 1.1. Модель структур молекул куркуміну I, II, III (куркумін, диметоксикуркумін, біс-диметіоксикуркумін).

Молекула куркуміну має кілька основних активних груп (Рис.1.2), які зумовлюють як фізико-хімічні, так і біологічні властивості куркуміну, а саме гідроксильна група, метоксильна група, активна метиленова група та дикетонна група. Гідроксигрупа та метоксигрупа зумовлюють мінімальну

розчинність молекули у воді та є перспективними мішенями для хімічних модифікацій в першу чергу через високу полярність гідроксигрупи [Singh, 2010, El-Gazzar, 2016]. Метиленова група є активним сайтом, що зумовлює швидкий метаболізм куркуміну та його виведення з організму, тому модифікації шляхом реакцій конденсації цієї групи є одним з варіантів підвищення біодоступності куркуміну [18].

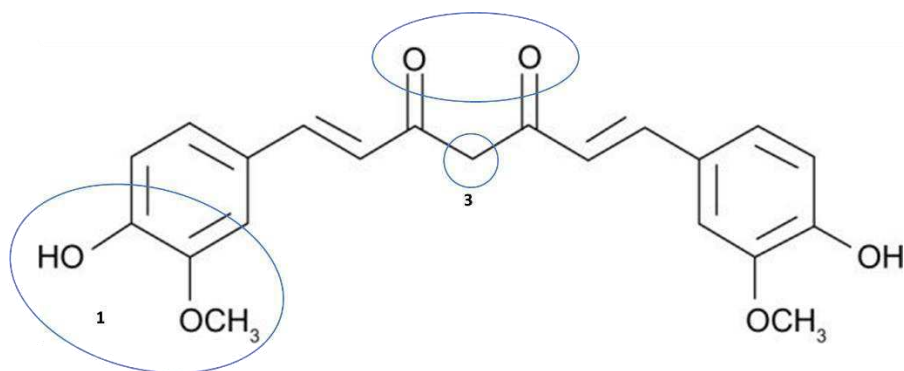


Рис. 1.2. Активні групи молекули куркуміну

Куркумін є рідкісним прикладом природного ліганду, що містить у своїй структурі групу β-дикетонів. Ця група може зумовлювати реакції конденсації, зокрема реакцію Шиффових основ [162]. Окрім цих груп, подвійні зв'язки, що містяться у лінійних частинах молекули можуть слугувати сайтом для нуклеофільного приєднання, що також є перспективною мішенню для створення більш стабільних хімічних похідних куркуміну [209].

Існує низка структурних аналогів куркуміну, які поділяють на три групи, а саме: природні похідні куркуміну з *Curcuma longa*, аналоги куркуміну, отримані з інших рослин (табл. 1.3) та синтетичні аналоги [216]

Куркумін, циклокуркумін, бісдеметоксикуркумін і деметоксикуркумін (зазвичай їх називають куркуміноїдами) є трьома основними аналогами куркуміну, отриманими безпосередньо екстракцією коренів *C.longa*. Деякі біологічно активні сполуки, які зустрічаються в природі також мають структурну подібність до куркуміну і визначаються як природні аналоги. Синтетичні аналоги куркуміну сполуки отримують шляхом модифікації основної структури куркуміну за допомогою різних хімічних реакцій.

Таблиця. 1.3. Структурні аналоги куркуміну [216]

Compound Name	Origin		PubChem CID	Molecular Formula
	Scientific Name	Common Name		
Curcumin natural derivatives from turmeric				
Curcumin	<i>Curcuma longa</i>	Turmeric	969516	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Bisdemethoxycurcumin	<i>Curcuma longa</i>	Turmeric	5315472	C ₁₉ H ₁₆ O ₄
Cyclocurcumin	<i>Curcuma longa</i>	Turmeric	69879809	C ₂₁ H ₂₀ O ₆
Demethoxycurcumin	<i>Curcuma longa</i>	Turmeric	5469424	C ₂₀ H ₁₈ O ₅
Curcumin natural analogs from mother nature				
Dehydrozingerone	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Ginger	5354238	C ₁₁ H ₁₂ O ₃
Cassumunin B	<i>Zingiber cassumunar</i>	Ginger	10054109	C ₃₄ H ₃₆ O ₉
Cassumunin A	<i>Zingiber cassumunar</i>	Ginger	10460395	C ₃₃ H ₃₄ O ₈
6-shogaol	<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	5281794	C ₁₇ H ₂₄ O ₃
6-paradol	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Ginger	94378	C ₁₇ H ₂₆ O ₃
6-gingerol	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	Ginger	442793	C ₁₇ H ₂₆ O ₄

Основними мішенями для структурної модифікації куркуміну є функціональної групи (гідроксильна, метоксильна, диестерна тощо), арильний бічний ланцюг та подвійний зв'язок. Також одним із найбільш вживаних модифікацій є утворення комплексів з металами [243]. Прикладом синтетичних аналогів можуть слугувати EF24 [248] та (1E,6Z)1,7-біс(13-фтор-9-етилкумарин-8-іл)-5-гідрокси3-оксогепта-1,4,6-трієн [80]

1.1.2. Способи отримання куркуміну

Починаючи з 1815 року, коли куркумін був вперше виділений з куркуми, і до 1970-х років було лише кілька повідомлень про його хімічну структуру, ізоформи, можливість хімічного синтезу, біохімічну та антиоксидантну активність [202, 247]. Все змінилося після публікації Aggarwal та його колег [1, 114, 211] у 1995 році щодо потенційного протипухлинного ефекту зумовленого дією куркуміну. Починаючи з цього часу темпи досліджень куркуміну стрімко зросли і залишаються стабільно високими і на сьогоднішній день (Рис.1.4).

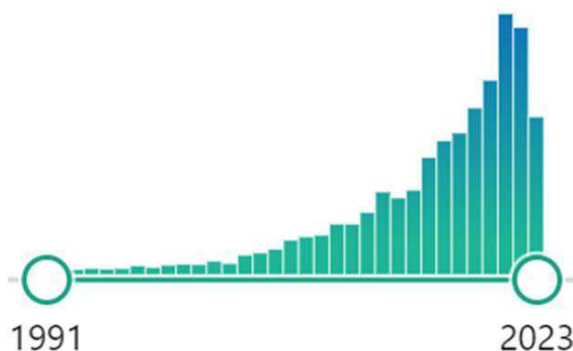


Рис.1.4. Кількість публікацій за ключовим словом «curcumin», згідно з PubMed.

Хоча більшість дослідників займалися безпосередньо біологічними аспектами впливу куркуміну та можливості його використання у широкій медичній практиці, ряд вчених розуміли необхідність визначення хімічної структури куркуміну, що відповідає за унікальну біологічну активність [116, 184]. Надзвичайно важливим етапом для будь-яких досліджень впливу та властивостей куркуміну є його екстракція та ідентифікація з коренів *Curcuma longa*. Найбільшим світовим виробником куркуми є Індія, де вона здавна використовується як традиційний засіб для лікування низки захворювань [1, 2, 61]. Залежно від походження та ґрунтових умов, де відбувається вирощування, куркума містить 2-15 % куркуміноїдів [70]. Хоча про екстракцію та розділення куркуміну з порошку куркуми повідомлялося ще в 1815 році, до сьогодні повідомляється про все більш економічні та ефективні методи екстрагування [105, 124, 125, 173, 229, 239].

Методи екстрагування куркуміну можна розділити на традиційні та сучасні. Найбільш поширеними традиційними методами отримання куркуміну є екстракція Сокслета та мацерація [121, 148]. Екстракція розчинником з наступною колоночною хроматографією для очищення куркуміну проводиться в кілька етапів, при цьому використовується кілька полярних і неполярних органічних розчинників, включаючи гексан, етилацетат, ацетон, метанол тощо. Куркумін можна виділити з куркумінової суміші (суміш куркуміну, диметоксикуркуміну та бісдиметоксикуркуміну) за допомогою

колонкової хроматографії шляхом адсорбції суміші на силікагелі з використанням сумішей розчинників, таких як дихлорметан/оцтова кислота або метанол/хлороформ, для отримання трьох різних фракцій. Фракцію куркуміну додатково очищають на силікагелі, використовуючи суміші хлороформ/дихлорметан та етанол/метанол як елюенти. З усіх використаних органічних розчинників етанол виявився найкращим розчинником для екстракції куркуміну [105]. Хоча хлоровані розчинники дуже ефективно екстрагують куркумін з куркуми, вони зазвичай не використовуються через їх неприйнятність у харчовій та фармакологічній промисловості [3, 160]. Екстракція за допомогою ультразвуку [34], екстракція за допомогою мікрохвиль [124, 265], екстракція за допомогою ензимів [194] є найпоширенішими методами в сучасному процесі екстрагування. Незважаючи на багато недоліків, такі як високі температури, тривалий час роботи і використання великої кількості органічних розчинників, традиційний метод екстракції широко використовується завдяки простоті процедур і низьким експлуатаційним витратам [22]. З огляду на дедалі ширше використання куркуміну з терапевтичною метою, в тому числі для перорального введення були розроблені методи екстракції з використанням харчових розчинників, таких як триацилгліцерини, які дають високі виходи куркуміну [229]. Спроби екстракції за допомогою ензимів, де попередню обробку куркуми проводили такими ензимами, як α -амілаза і глюкоамілаза, призвела до значного збільшення виходу куркуміну. Однак через збільшення вартості екстракції цей метод не став комерційним [112]. Іншим комерційно життєздатним та ефективним методом екстракції куркуміну є використання вуглекислого газу [23, 35].

Ідентифікацію та кількісне визначення отриманого куркуміну проводять з використанням одного або декількох методів хроматографії, таких як тонкошарова хроматографія вискоефективна рідинна хроматографія та мас-спектрометрія [51, 59, 71]. Для виявлення куркуміну прості і надзвичайно корисні абсорбційні детектори в діапазоні довжин хвиль від 350 до 450 нм або

в УФ-області з використанням загальної довжини хвилі детектування в діапазоні від 250 до 270 нм. Мас-спектрометрія з рідинною хроматографією також є одним з універсальних інструментів для виявлення куркуміну. З усіх перерахованих методів найбільш чутливим для виявлення куркуміну (до 1 нг/мл) є метод флуоресценції, що збуджується в області від 400 до 450 нм. Високоєфективні методи тонкошарової хроматографії з використанням алюмінієвих пластин, попередньо покритих силікагелем як нерухомою фазою, і хлороформ-метанолом як розчинником, виявилися дуже корисними як для виявлення, так і для розділення куркуміну з куркуміноїдною сумішшю [12]. Окрім того, капілярний електрофорез з амперометричним детектуванням може бути рутинно використаний для оцінки куркуміну/куркуми в фармакологічних продуктах [226].

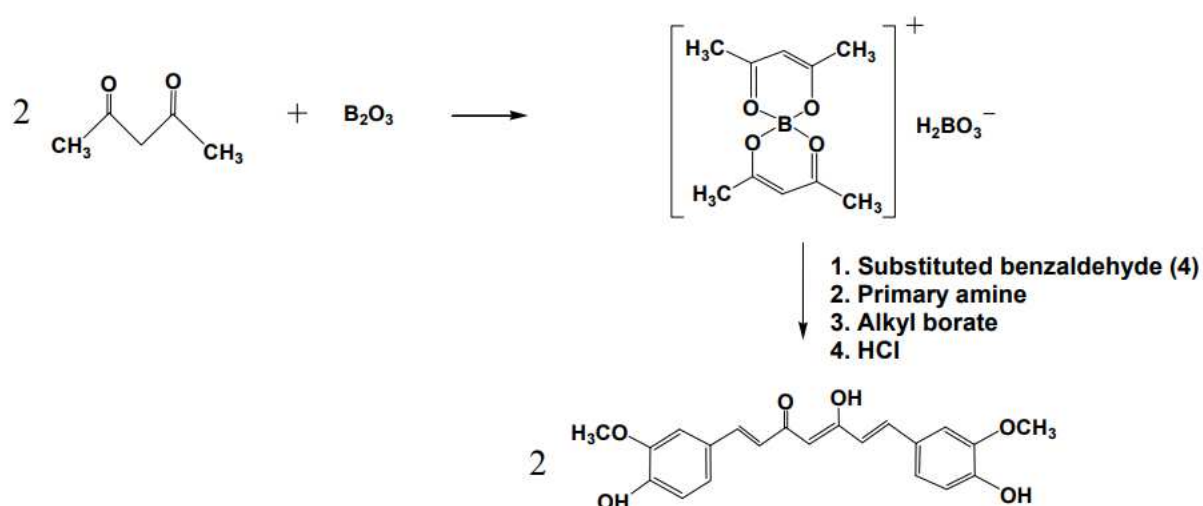


Рис. 1.5. Загальна схема хімічного синтезу куркуміну [167].

Окрім промислово важливих для харчової та фармакологічної промисловостей методів екстракції та очищення куркуміну з природної сировини існують комерційно важливі способи отримання куркуміну шляхом його хімічного синтезу. Практично через століття після першого виділення куркуміну з куркуми [247], перша стаття про синтез куркуміну була опублікована Лампе в 1913 році [118]. Метод включав п'ять стадій і починався з конденсації карбометоксиферулоїлхлориду та етилацетоацетату. Пізніше Rabon [167] описав більш простий метод синтезу куркуміну з високими

виходами, використовуючи ацетилацетон і заміщені ароматичні альдегіди за присутності триоксиду бору (B_2O_3), триалкілборату і н-бутиламіну.

Куркумін, утворений в результаті запропонованої схеми реакції (Рис.1.5.) з реакційної суміші можна відокремити промиванням і повторним осадженням з наступною колонковою хроматографією.

1.1.3. Фізико-хімічні властивості куркуміну

Куркумін є майже нерозчинним у воді поліфенолом, який добре розчинний в полярних розчинниках, зокрема таких як ДМСО, метанол, етанол, ацетонітрил, хлороформ, етилацетат тощо. У таких вуглеводневих неполярних розчинниках як циклогексан і гексан куркумін також є добре розчинним. Серед полярних розчинників куркумін має найвищу розчинність у лужних розчинах через іонізацію гідроксильних груп. Проте концентровані лужні розчини призводять до зниження стабільності молекули куркуміну та її швидкої деградації [235]. Питання підвищення розчинності куркуміну у безпечних для фармакологічних цілей розчинниках є одним з напрямків сучасних досліджень. Зокрема, було показано, що розчинність куркуміну з сухої дисперсійної форми значно підвищується у синтетичних полімерних речовинах, таких як Soluplus® [8].

Вивчення спектральних властивостей куркуміну показало, що молекула має два максимуми поглинання: один знаходиться у видимій області спектру і має діапазон від 410 до 430 нм; інший максимум знаходиться в ультрафіолетовій області і має максимум біля 265 нм. Молярний коефіцієнт екстинкції куркуміну в метанолі становить $55000 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 425 нм [179, 242].

На спектральні властивості будь-якої речовини впливає її оточення, зокрема тип розчинника. Оскільки куркумін є добре розчинним у низці полярних та неполярних розчинників, то спектр абсорбції та флуоресценції буде відрізнятися для кожного розчинника (Рис.1.6).

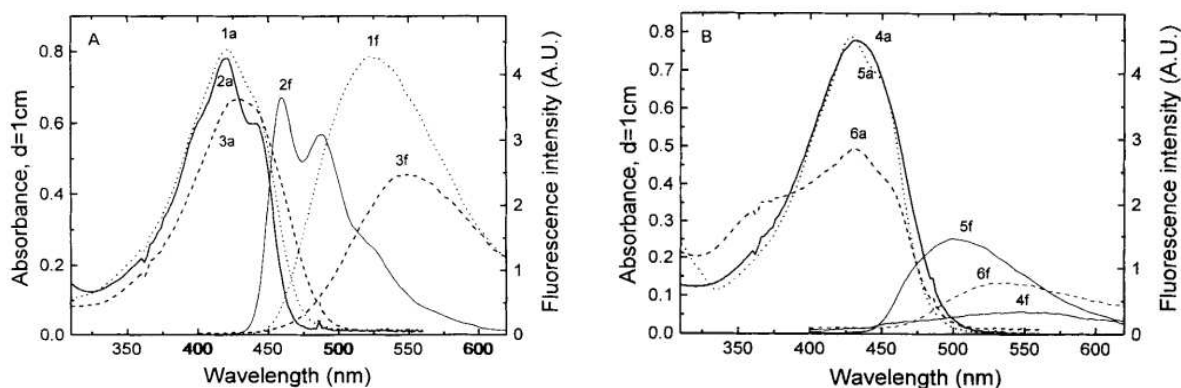


Рис.1.6. Спектри поглинання та флуоресценції куркуміну. Спектри поглинання в ацетонітрилі, толуолі та етанолі; лінії 1a, 2a і 3a відповідно; спектри флуоресценції в ацетонітрилі, толуолі і етанолі; лінії 1f, 2f і 3f відповідно; спектри поглинання в міцелах SDS, Triton X-100 та N,N-диметилформаміді (DMF); лінії 4a, 5a і 6a відповідно, спектри флуоресценції в SDS, міцелах Triton X-100 і в лініях DMF 4f, 5f і 6f. Куркумін = 15 пМ. A = 375 нм [179].

При опроміненні в органічному або міцелярному розчині поглинання куркуміну зменшувалося, що свідчить про те, що куркумін з часом вигоряє. Нелінійна швидкість вигорання призводить до накопичення продуктів фотодеградації, що поглинають в тому ж діапазоні довжин хвиль, що й куркумін, але, очевидно, є більш фотостабільними [45].

Куркумін природно існує у двох таутомерних формах – енольна та кетоформа, які легко переходять одна в одну (таутомерія) [36]. Окрім того куркумін можна розглядати як слабку кислоту Бренстеда, що має три рухомих протони, і, відповідно, три рКа, які можуть бути описані рівняннями динамічної рівноваги (Рис.1.7).

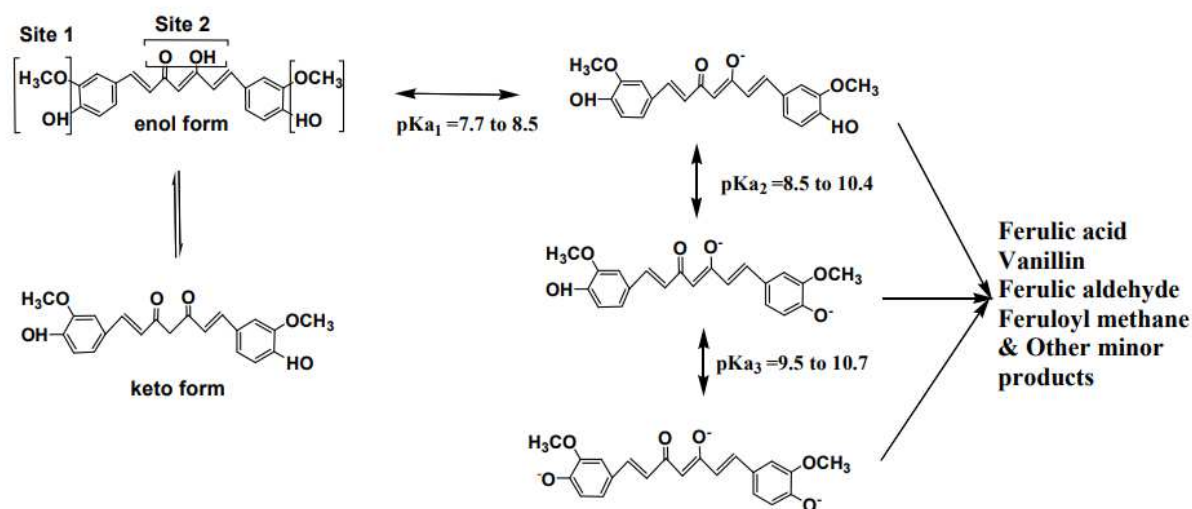


Рис. 1.7. Туаімерні перетворення та реакції дисоціації куркуміну.

Було показано, що pK_{a1} знаходиться в діапазоні рН від 7,5 до 8,5 і характеризується зміною кольору від жовтого до червоного. pK_{a2} та pK_{a3} , вказані на Рис 1.6, на кілька порядків нижчі за pK_{a1} , що робить їх розрахунок та аналіз менш значимими в контексті дослідження біологічних властивостей куркуміну [178].

Куркумін зазнає хімічної деградації в водних та органічних розчинниках, що є серйозною перешкодою для його використання. Крім того рівень деградації збільшується з підвищенням рН [207]. У розбавлених розчинах 90% куркуміну деградує впродовж перших 30 хвилин. Основними продуктами деградації куркуміну є транс -6(4'-гідрокси-3'-метоксифеніл)-2,4-діоксо-5-гексанал, феруловий альдегід, ферулова кислота, ферулоїлметан та ванілін (рис 1.6). Також відомо, що рівень деградації є значно меншим, коли до нього додають ліпіди, ліпосоми, альбуміни, циклодекстрин, кукурбітурил, ПАР, різноманітні синтетичні полімери і багато інших високомолекулярних і мікрогетерогенних систем. Однією з таких систем є широкоживана фетальна бичача сироватка, використання 10% розчину якої як середовища для розчинення куркуміну, зберігає стабільність останнього впродовж тривалого часу [178].

Окрім хімічної деградації куркумін піддається метаболічним перетворенням при потраплянні до організму. Шляхи метаболізму

відрізняються у людей та щурів [89, 249]. Існує два основні шляхи, за якими відбувається метаболізм куркуміну: О- кон'югація і відновлення. О-кон'югація (окиснення) куркуміну призводить до утворення куркумін-глюкуроніду та куркумін-сульфату [20]. Результатом відновлення є такі продукти, як тетрагідрокуркумін, гексагідрокуркумін і октагідрокуркумін. Мінорними побічними продуктами є дигідрокуркумін глюкуронід, тетрагідрокуркумін глюкуронід, ферулова кислота і дигідроферулова кислота [65, 82]. Вважається, що кожна реакція метаболічного шляху деградації куркуміну каталізується специфічним ензимом. Проте на сьогодні вони не ідентифіковані і залишаються предметом для вивчення. Є дані, щодо того, що сульфування куркуміну за допомогою сульфур-фенол-трансфери людини з наступним відновленням продуктів під дією алкогольдегідрогенази може бути одним з можливих шляхів метаболізму куркуміну у людини [65]. Оскільки продукти хімічної та метаболічної деградації частково перетинаються, то все ще залишається відкритим питання у відмінностях цих процесів та рівні їх впливу на низьку біодоступність куркуміну для живих організмів.

1.2 Біологічні властивості куркуміну

1.2.1. Механізми дії куркуміну

Широкий спектр біологічних активностей куркуміну пояснюється величезною кількістю молекул-мішеней, на які здатен впливати куркумін. На Рис 1.8 представлено відомі на сьогоднішній день мішені для куркуміну [200]. Активація куркуміном одних мішеней та інгібування інших є більшості випадків призводить до індукування апоптозу, що є провідним механізмом протипухлинного, антипроліферативного, імуномодуючого, антибактерійного впливу куркуміну. Детальніше розглянемо найбільш значущі фактори.

Фактори транскрипції, такі як AP-1 та низка інших посередників передачі сигналу, включаючи молекули адгезії, кілька кіназ, таких як рецепторні тирозинкінази, мітоген-активовані протеїнкінази (MAPK) та c-jun N-terminal-

кінази (JNK) впливають на перебіг медикаментозно-індукованого апоптозу клітин [107].

Деякі пухлинні клітини знижують рівень апоптозу шляхом активації ядерного фактора NF-κB/Rel [100]. Куркумін індукує апоптоз, знижуючи експресію NF-κB в пухлинних клітинах яєчників та його активність у клітинах меланоми [268]. Клітини CD¹³⁸⁺, отримані від хворих на мієлому, демонструють конститутивно активні NF-κB та STAT3, і супресія цих факторів транскрипції куркуміном пригнічує виживання клітин, що в свою чергу і призводить до апоптозу [25]. Akt-кіназа, Ser/Tre протеїнкіназа та фосфатидилінозитол-3-кіназа є супресорами апоптозу за шляхом активації NF-κB [166, 190].

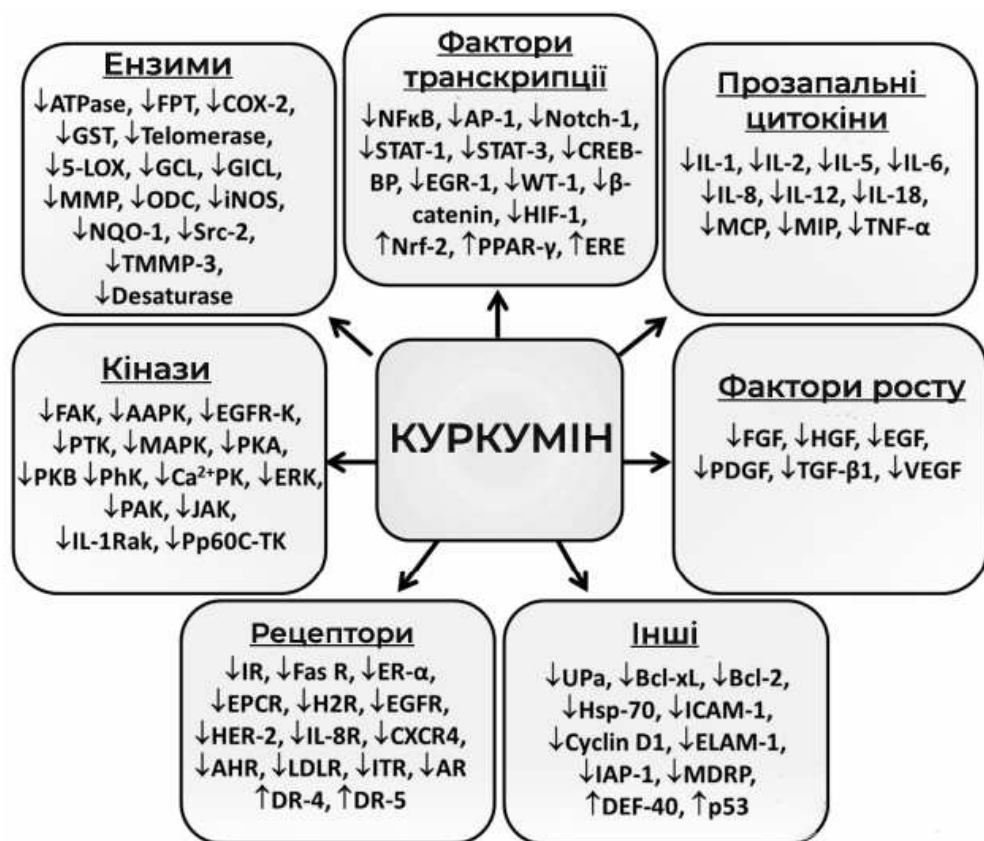


Рис. 1.8. Молекулярні мішені, які модулюються куркуміном. Стрілкою вниз (↓) позначено інгібування активності; Стрілкою вверх (↑) позначено підвищення активності [200].

Куркумін викликає підвищення проникності мембрани, втрату мембранного потенціалу та пригнічення синтезу АТФ, що опосередковано відкриває пори в ізольованих мітохондріях печінки щурів [149]. Активація каспази 3 і розщеплення PARP і Bid, вивільнення мітохондріями цитохрому c та активація каспази 8 у відповідь на дію куркуміну (25 мкМ) є основою мітохондрійного шляху для апоптозу, індукованого куркуміном у клітинах HL-60 [15, 258].

Ще однією важливою мішенню куркуміну є пухлинний супресор протеїн p53. Основними типами мутацій p53, що сприяють інвазії та міграції пухлинних клітин, є міссенс-мутації, мутації за типом зсуву рамки считування та сплайсінг-мутації [43]. Внесення куркуміну викликає p53- і p21-незалежний арешт клітинного циклу та апоптоз у ракових клітинах товстої кишки людини HCT-116 з генотипом p53 (+ / +), p53 (- / -) та p21 (- / -)[90].

Оксидативний стрес, викликаний утворенням активних форм кисню (АФК) та зниженням рівня глутатіону також розглядаються як важливі активатори апоптозу [87]. Будучи ліпофільною сполукою, куркумін може долати трансмембранний мітохондрійний бар'єр та збільшувати проникність для протонів. Як наслідок, відбувається пригнічення акумуляції енергії АТФ в мітохондрії, що може призвести до збільшення кількості ROS, що розглядається як один із факторів цитотоксичності куркуміну, оскільки чутливість багатьох пухлинних клітин до куркуміну корелює з генерацією супероксидних радикалів [103]. У цьому випадку куркумін є прооксидантом, що підвищує активність антиоксидантних ензимів [188, 189] та збільшує рівень глутатіону [253].

У цьому розділі нами були розглянуті основні молекулярні механізми, на які впливає куркумін. У наступному розділі буде проаналізовано особливості біологічних відповідей пухлинних клітин при дії куркуміну.

1.2.2. Вплив куркуміну на живі організми

Протипухлинна та антипроліферативна активність куркуміну

Куркумін має антипроліферативний вплив як на стадії ініціювання онкологічного захворювання, так і під час розвитку і прогресуванні пухлин [54, 180]. Кілька досліджень на тваринах показали, що куркумін має дозозалежний хіміопрофілактичний ефект при канцерогенезі товстої кишки, дванадцятипалої кишки, шлунка, стравоходу та перорального вузла [134, 159]. Під дією куркуміну відбувається зменшення розміру пухлин, індукованих дією бензапірену і 7,12- диметилбензаантрацену [52], а також затримка розвиток пухлин, індукованих форболовими ефірами на шкірі миші [85]. Далі детальніше розглянемо вплив куркуміну на різні типи онкологічних захворювань.

Вплив куркуміну на рак грудної залози

Є різні ступені злоякісності та стадій пухлинного росту раку грудної залози [7]. Більше 70% випадків раку грудної залози мають підвищений рівень експресії рецептора естрогену (ER) на своїй поверхні, тому антиестрогени часто використовуються як основне лікування. Проте все більше доказів показує, що поєднання різних препаратів представляє найкращу стратегію лікування раку грудної залози. Куркумін проявляє активність як щодо естроген-позитивних, так і естроген-негативних клітин раку грудної залози. Куркумін володіє плейотропними ефектами, якими модулює активність пухлинних клітин, пригнічуючи проліферацію малігнізованих клітин, прогресування канцерогенезу, активність метастазування, розвиток ангиогенезу тощо. Розглянемо основні відомі ефекти куркуміну на фізіологічні відповіді клітин раку грудної залози.

У проліферації клітин раку грудної залози NF-κB — прозапальний фактор транскрипції — відіграє ключову роль. Він регулює транскрипцію понад 500 різних генів, продукти яких модулюють стан активності сигнальних шляхів клітин, які регулюють, зокрема, розвиток запалення, що може

призвести до індукції канцерогенезу. Сполуки, здатні взаємодіяти з NF- κ B, шляхом його інгібування, можуть бути використані в терапії онкологічних захворювань [104, 113, 127].

Іншими мішенями, що впливають на проліферацію клітин раку грудної залози, є рецептори епідермального фактору росту EGFR/ HER1 та HER2. HER2 розглядається як фармакологічна мішень для лікування, оскільки його надмірна експресія призводить до розвитку багатьох видів пухлинних хвороб [106]. Куркумін, окремо або в поєднанні з його аналогами, може пригнічувати життєздатність клітин раку грудної залози за рахунок інгібування тирозинкіназної активності HER2 рецептору [264].

Ще одним механізмом, залученим до канцерогенезу, є зміни (мутація чи ампліфікація) у протеїнкіназі B (Akt-кіназа) [191]. Разом з мutowаною Akt кіназою, mTog-кіназа посилює ріст та проліферацію малігнізованих клітин, сприяючи розвитку захворювання [230]. У клітинах раку грудної залози куркумін знижує активність кінази Akt у дозо- та часо- залежний спосіб, а також індукує автофагію та пригнічує убіквітин-протеасомний шлях [74]. Крім того, була висунута гіпотеза про те, що здатність куркуміну до індукції апоптозу та аутофагії у клітинах раку грудної залози здійснюється шляхом блокування сигнального шляху PI3K/Akt [5]. Було продемонстровано підвищений рівень апоптозу клітин MCF-7 після їх обробки комбінацією куркуміна та інгібітора PI3K, що свідчить про їх синергічний ефект [92].

Куркумін також здатний перешкоджати EGFR-залежному клітинному сигнальному шляху, який, як повідомляється, пов'язаний з проліферацією, адгезією, міграцією, і диференціюванням ракових клітин [220, 262]. Таким чином, модулювання EGFR є хорошою стратегією для лікування раку. Куркумін пригнічує ріст і проліферацію клітин раку грудної залози шляхом зменшення передачі сигналів EGFR і зниження рівнів EGFR і Akt [217, 227].

Ще одним прикладом того, як куркумін реалізує свої протипухлинні та антипроліферативні властивості є модулювання фактора транскрипції Nrf2, який регулює активність генів, відповідальних за детоксикацію молекул-

електрофілів і ROS та елімінацію або відновлення деяких пошкоджених ними продуктів [115].

Відомо, що естроген-негативні клітини раку грудної залози MDA-MB-231 мають високий рівень інвазивності за рахунок двох протеїнів - MMP-2 (матричної металопротеїнази) та TIMP-1 (тканинний інгібітор металопротеїнази), що є функціональними антагоністами. Було показано, що куркумін здатний викликати зменшення інвазивності цих клітин шляхом інгібування MMP-2 разом з паралельною активацією TIMP-1 (тканинний інгібітор металопротеїнази) [201].

Вплив куркуміну на рак легені

Пухлинні захворювання легені є ще одним широко розповсюдженим захворюванням з високим рівнем летальності, зокрема серед чоловіків [64]. Було показано, що куркумін здатний пригнічувати фактор NF-κB при впливі на клітинну лінію A549, а також інгібувати сигнальний шлях JAK2/STAT3 [256]. Крім того, було продемонстровано, що куркумін здатний пригнічувати проліферацію і навіть індукувати апоптоз шляхом інгібування PI3K/Akt сигнального шляху та стимулювання утворення мікроРНК-192-5p для недрібноклітинного раку легені [94]. Ще одним механізмом впливу куркуміну в клітинах легеневої аденокарциноми є пригнічення експресії низки протеїнів, зокрема COX-2, EGFR та ERK (кіназа, що регулюється позаклітинним сигналом), що призводить до підвищення рівня апоптозу і знижує життєздатність клітин аденокарциноми [122].

Вплив куркуміну на неоплазії гемопоетичного походження

Гематологічні пухлинні захворювання пов'язані із трансформацією клітин крові та кісткового мозку. Найбільш розповсюдженими є такі захворювання як лімфома, лейкемія та множинна мієлома. Було показано, що куркумін здатен індукувати апоптоз В-клітин хронічної лімфоїдної лейкемії шляхом інгібування STAT3, Akt, NF-κB, and X-зв'язаного інгібітора

апоптичного протеїну (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) [68, 170]. Окрім того, було показано, що куркумін здатний викликати апоптоз шляхом активації JNK/ERK/AP1 шляху у клітинах THP-1 гострого моноцитарного лейкозу [259].

У клітинах хронічного мієлолейкозу протипухлинні властивості куркуміну проявлялися шляхом підвищення активності PTEN, одного з мутованих або «мовчазних» пухлинних супресорів, що є однією з причин трансформації клітин. PTEN, в свою чергу, є мішенню miR-21, мікроРНК, що є гіперекспресованою в багатьох видах пухлинних клітин. Куркумін індукував опосередковану miR-21 модулювання шляху PTEN/АКТ, викликаючи пригнічення росту малігнізованих клітин *in vitro* та *in vivo* [234].

Лімфоми є п'ятим за поширеністю пухлинним захворюванням і п'ятою основною причиною смертності від раку в західних країнах. У лімфомі Беркітта — неходжкінській лімфомі високого ступеня злоякісності — куркумін пригнічував активність шляху NF-κB за рахунок інгібування його активатор PI3K/Akt Цей ефект викликав апоптоз у трьох клітинних лініях лімфоми Беркітта людини, а саме Namalwa, Ramos і Raji, які були оброблені іонізуючим випромінюванням як фактором канцерогенезу [56]. Куркумін також впливає на інтерлейкін-1 (IL-1α та IL-1β), потужний та багатофункціональний прозапальний цитокін, який бере участь у прогресуванні розвитку пухлини через експресію метастатичних та ангіогенних генів і факторів росту. Куркумін знижував канцерогенез шляхом зниження секреції прозапального цитокіну інтерлейкіну-1 (IL-1α та IL-1β) через модуляцію AP-1 та NF-IL6, що було показано на моделі мишей з лімфомою [49].

Таким чином можна зробити висновок про універсальність куркуміну як протипухлинного агента, який здатен інгібувати канцерогенез, метастазування, міграцію малігнізованих клітин різної природи. Вплив куркуміну опосередкований багатьма шляхами, які зводяться в першу чергу до індукції апоптозу через модуляцію різноманітних сигнальних шляхів.

Протизапальна та антиоксидантна активність куркуміну та його
імуномодулювальний вплив

Багато з терапевтичних ефектів куркуміну, пов'язані з його здатністю пригнічувати гостре і хронічне запалення [208]. Дослідження *in vitro* показали, що куркумін пригнічує активність ліпооксигенази та циклооксигенази у індукованому форбол-12-міристаті-13-ацетатом запалені клітин мишачих фібробластів [86], активності ксантинових оксигеназ у клітинах NIH3T3 [126], синтез оксиду азоту в мишачих макрофагах RAW264.7 [28] і генерування активних форм кисню (ROS) в активованих перитонеальних макрофагах щурів [95]. Ще одне дослідження показало, що окислювальна стимуляція протеїнів G в мембранах людського мозку метаболічними прооксидантами, гомоцистеїном і перјrcblјv водню може бути значно пригнічена дією куркуміну [91]. Окрім того було доведено, що куркумін пригнічує перекисне окислення ліпідів у препараті мікросом печінки щурів [189], а також у гомогенатах мозку щурів, де куркумоніди фактично проявляють більш сильну антиоксидантну активність, ніж альфа-токоферол [186].

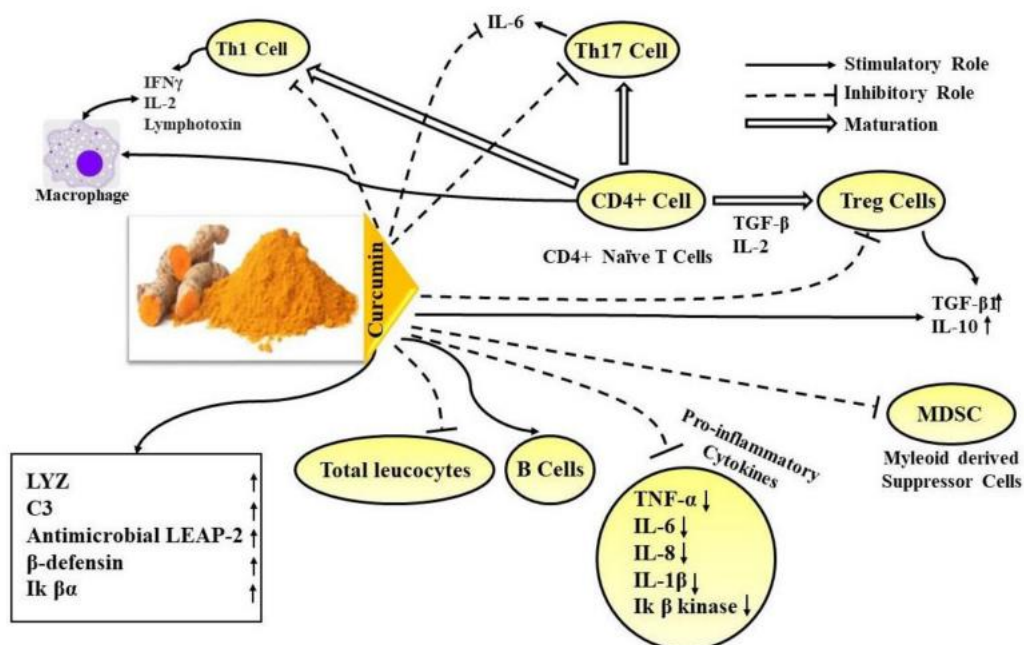


Рис.1.9. Імуномодулювальні ефекти куркуміну [239]

На сьогоднішній день відомо, що куркумін може проявляти себе і як модулятор гуморальної та клітинної імунної відповіді (Рис. 1.9). Хоча питання

імуномодуляторної активності куркуміну тільки на початку свого вивчення і потребує великої кількості різносторонніх досліджень, вже показано, що куркумін здатен підсилити продукцію антитіл плазматичними клітинами. Крім того, куркумін здатен інгібувати утворення прозапальних цитокінів макрофагами та лімфоцитами та проліферативну та цитотоксичну відповідь Т-лімфоцитів *in vitro*. Показано, що провідну роль в описаних модуляціях відіграє інгібування куркуміном факторів NF-κB та AP1 [2].

Нейропротекторна дія куркуміну

Завдяки своїй багатогранній фармакологічній дії куркумін став об'єктом дослідження щодо можливості використання для лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера (AD) [187], хвороба Паркінсона (PD) [152]. AD характеризується відкладенням β-амілоїдних (Aβ) бляшок у паренхімі мозку з подальшою втратою синаптичних зв'язків і загибеллю нейронів. Депонований Aβ реагує з активованою мікроглією з ROS і цитохемокинами, що призводить до важкого нейрозапалення. Для підвищення біодоступності куркуміну було сформовано полімерні наночастинки з інкапсульованим куркуміном (NanoCurs™), що є повністю розчинним у воді. Лікування NanoCurs™ захищає нейронно диференційовані людські SK-N-SH клітини від опосередкованих ROS (H₂O₂) інсультів, що попереджає розвиток AD [152, 187].

Вплив куркуміну на серцево-судинну систему

Серед широкого спектру біологічної активності куркуміну відзначають і його позитивний вплив на загальний стан серцево-судинної системи. Зокрема, показано, що куркуміноїди можуть знижувати рівень циркуляційного С-реактивного протеїну, який розглядається як маркер та незалежний фактор ризику серцево-судинних захворювань [193]. Окрім того, доведено, що куркумін проявляє ефективність проти розвитку інфаркту міокарда та атеросклерозу [2]. Іншими вченими зазначено зниження рівня тригліцеридів, ліпопротеїдів низької щільності та загального холестерину під впливом куркуміну [111]. Swamy з колегами показали, що куркумін запобігає

кардіоміопатії, спричиненій доксорубіцином. Під дією куркуміну збільшується рівень глутатіону (GSH), супероксиддисмутази (SOD) і каталази (CAT) [228].

Вплив куркуміну на перебіг цукрового діабету

Багатогранність використання куркуміну у терапевтичних цілях охоплює і його позитивний вплив на перебіг таких метаболічних захворювань, як діабет. При пероральному прийомі куркуміну щурами з діабетом відмічали зниження рівня цукру та гемоглобіну в крові [19]. Murudan та Parі показали зниження рівня загальних протеїнів в плазмі крові, в тому числі зниження рівня альбуміну, глобуліну, альбумін/глобулін співвідношення, які практично прийшли до норму у щурів з діабетом, які тривалий час вживали куркумін [151].

Антибактерійні та антивірусні властивості куркуміну

Як відомо, куркумін має пряму антибактерійну активність щодо широкого спектру бактерій. За відсутності світла куркумін виявляв незначний антибактерійний ефект. Різні дослідження порівнювали ефективність цитотоксичності куркуміну між грампозитивними (*Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *Enterococcus faecalis*) і грамнегативними бактеріями (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Sarcina lutea*). Tonnesen et al. вивчали фотобіологічний ефект куркуміну на бактерійних системах і продемонстрували, що в умовах видимого спектра світла куркумін проявляє фототоксичну дію щодо *Salmonella typhimurium* і *E.coli* при дуже низьких концентраціях [235]. Нещодавно оцінювалися фототоксичні ефекти куркуміну з ацинарними клітинами слинних залоз і отримані результати показали, що мікромолярні концентрації куркуміну, у сполучені з низьким рівнем освітленості, були ефективними в лікуванні уражень порожнини рота [29].

Окрім виражених антибактерійних властивостей, куркуміну притаманна протівірусна активність як щодо ДНК-вмісних, так і РНК-вмісних вірусів. Починаючи з 90-х років минулого століття куркумін почали застосовувати як агент комбінованої терапії для лікування вірусних захворювань [17].

Дослідження механізмів антивірусної активності куркуміну показало кілька можливих шляхів. Зокрема, для складних вірусів, що мають суперкапсид, була показана взаємодія куркуміну з поверхневими протеїнами суперкапсиду, що призводило до зменшення вірусного навантаження в клітині [42, 44]. Як було вперше описано Лі зі співавторами, куркумін впливає на ліпідний бішар мембрани суперкапсиду як агент, що також затримує потрапляння вірусу до клітини-хазяїна [88]. Крім того, численні дослідження показали, що куркумін перешкоджає проникненню різних вірусів у клітини та продукції нових вірусних частинок за рахунок його взаємодії з поверхневими протеїнами вірусу [154]. Chen та ін., виявлено зниження на 90% вірусного навантаження грипу в інфікованих клітинних лініях MDCK, оброблених 30 мкМ куркуміном. Крім того, вони показали прямий вплив куркуміну на H1N1 та H6N1 щодо зниження інфекційності через блокування гемаглютинації [39].

1.3. Способи підвищення біодоступності куркуміну

1.3.1. Низька біодоступність куркуміну

Незважаючи на перспективність використання куркуміну через багатогранність його біологічних властивостей, що можуть бути використані у фармакологічній промисловості, низька біодоступність куркуміну є основним недоліком, що ускладнює його розвиток як ефективного терапевтичного засобу. Фармакокінетика куркуміну доводить його низьку біодоступність не лише на рівні клітин, а й на рівні організму. Фармакокінетику куркуміну у мишей порівнювали за допомогою перорального або внутрішньоочеревного введення. При введенні куркуміну перорально в дозі 0,1 г / кг рівень куркуміну в плазмі досягав найвищої концентрації (0,22 мкг / мл) через 1 год; потім різко знижувався до рівня нижче 5 нг / мл протягом 6 годин. Куркумін, що вводився через внутрішньоочеревинну порожнину (0,1 г / кг), в концентрації в плазмі досягав максимального значення в 2,25 мкг / мл, але швидко знижувався протягом 1

год. Між тим, розподіл куркуміну в основному концентрувався в кишечнику (> 100 мкг / г), далі йдуть селезінка (26,1 мкг / г), печінка (26,9 мкг / г), нирки (7,5 мкг / г) і тканина мозку (0,4 мкг) [169]. Було показано, що максимальний рівень куркуміну в сироватці становив $0,36 \pm 0,05$ мкг / мл, коли щурам через внутрішньовенне введення вводили 10 мг / кг куркуміну, в порівнянні з $0,06 \pm 0,01$ мкг / мл куркуміну у сироватці, коли прийом був пероральним, хоча доза була у 50 разів вище при пероральному введенні [260]. Виходячи з результатів цих досліджень, зрозуміло, що шлях введення відіграє важливу роль у сироватковому рівні куркуміну, в якому біодоступність куркуміну значно нижча при пероральному введенні в порівнянні з внутрішньочеревинними та внутрішньовенними шляхами.

Велика гідрофобна частина молекули куркуміну призводить до поганої розчинності у воді, що частково призводить до низької біодоступності в організмі людини. Окрім того, швидкий катаболізм куркуміну та його швидке окиснення [248] обмежує терапевтичне застосування куркуміну, хоча в традиційній східній медицині він відомий з давніх часів. Протягом багатьох років дослідження вказували на низьку біодоступність куркуміну *in vivo*, включаючи низький рівень абсорбції та високу швидкість метаболізму.

Існує кілька перспективних способів підвищення біодоступності куркуміну включаючи хімічні модифікації [75], везикулярні платформи доставки на основі наночастинок [78], екзосоми [163] або міцели [79], а також утворення комплексів з протеїнами та іншими біомолекулами [237]. Серед них платформи на основі протеїнів для цільової доставки куркуміну до певних типів пухлинних клітин вважаються головним практичним інтересом через можливість використання природних поліпептидних лігандів для певних типів рецепторів, пов'язаних із раком.

1.3.2. Використання везикулярних транспортних систем

Одним з можливих способів підвищення біодоступності куркуміну є його упаковка в екзосоми. Добре відомо, що як прокаріотичні, так і

евкаріотичні клітини здатні утворювати невеликі мембранні пухирці, які називають позаклітинними везикулами. Ці везикули можна виділити з широко спектру клітин, а також їх можна знайти в різних рідинах організму, наприклад у сечі, слині, спинномозковій рідині, плазмі та сироватці [55]. Існує три основні типи позаклітинних везикул, а саме апоптотичні тільця (1–5 μm у діаметрі), мікровезикули (100–1000 нм), що утворюються брунькуванням плазматичної мембрани назовні, та екзосоми (30–100 нм) – це нановезикули, які утворює всередині клітини ендоплазматичний ретикулум [98], які останнім часом привертають увагу багатьох дослідників [62]. Екзосоми різних клітин містять широкий спектр різноманітних біологічно активних речовин, таких як протеїни, ліпіди, нуклеїнові кислоти тощо. Більше того, екзосоми здатні транспортувати свій вантаж між клітинами як з прямим контактом між клітинами так і без нього [182]. Оскільки екзосоми функціонують як транспортні засоби міжклітинного зв'язку для передачі їх вміст у клітини-реципієнти, вони привернули велику увагу як спосіб доставки терапевтичних препаратів [141]. Є кілька переваг використання екзосом як системи доставки ліків. Ці переваги включають їх біосумісність [83], нанорозмір екзосом дозволяє їм долати природні бар'єри і проникати вглиб тканин [244], вони мають власні рецептори, що забезпечує адресну доставку [83] і тривалий час циркуляції через негативний Zeta-потенціал [192]. Крім того, більшість екзосом є багатими на ліпіди гідрофобними структурами. Ця особливість може бути використана для доставки гідрофобних терапевтичних агентів, зокрема куркуміну [224]. Загалом, екзосоми є ідеальними природними транспортними засобами для доставки ліків при клінічному застосуванні. Використання екзосом як системи доставки ліків було вперше показано Sun з колегами, коли куркумін, інкапсульований в екзосоми, був доставлений в клітини-мішені шляхом злиття з плазматичною мембраною [223].

Однією з найважливіших передумов для клінічного застосування екзосом є стандартизація процесу виділення, очищення та характеристики екзосом на основі функції, відтворення та чистоти. Загалом, щоб отримати

екзосоми у великому масштабі, процес виробництва послідовно включає культивування донорських клітин, збір середовища клітинної культури, що містить високу концентрацію екзосом та очищення екзосом [120].

Наступним важливим кроком використання екзосом є їх упаковка. Терапевтичні агенти можуть бути завантажені в екзосоми за допомогою двох основних методів: активного або пасивного. Ці методи призводять до різного виходу завантаження та стабільності терапевтичного агента в екзосомах. Підходи до пасивного завантаження є відносно простими, не вимагають додавання активних речовин і складаються з інкубації терапевтичного агента з екзосомами або інкубації ліків з донорськими клітинами. Ізольовані екзосоми можна просто інкубувати з різною концентрацією препарату, дозволяючи препарату дифундувати в екзосоми на основі градієнта концентрації. Ефективність завантаження залежить від гідрофобності чи гідрофільності молекул препарату. Гідрофобні препарати можуть активніше взаємодіяти з ліпідними шарами мембрани везикул [223]. Наприклад, Sun з колегами у 2010 році підготували екзосомний куркумін шляхом інкубації екзосом, отриманих від мишачої лімфоми, з куркуміном при 22°C протягом 5 хвилин, а потім екзосомний куркумін очищали градієнтним центрифугуванням [223]. Інший метод пасивної упаковки включав завантаження донорських клітин перед виділенням екзосом [130, 196]. У техніці електропорації на екзосоми впливало електричне поле, що призводило до створення дрібних пор в екзосомальній мембрані та порушення цілісності фосфоліпідного бішару, що дозволяло препаратам проникати в екзосоми [130].

Ще одним перспективним способом підвищення стабільності та біодоступності куркуміну є його розчинення у фосфоліпідному бішарі або ліпосомах [33, 212]. Було показано, що ліпосомальний куркумін покращив свої фармакологічні властивості та, як наслідок, свою протипухлинну активність. Ліпосомальний куркумін можна отримувати з додаванням різноманітних біологічних сполук, зокрема вітаміну А, поліетиленгліколю, гіалуронової

кислоти, діоксиду кремнію та фолієвої кислоти, що сприяє більш ефективній реалізації куркуміном своїх активностей [30].

Кілька досліджень показали вирішальну роль фосфоліпідів у покращенні терапевтичної ефективності малих молекул з низькою біодоступністю [13, 14, 38, 185]. Незважаючи на свою фенольну природу та низьку розчинність, куркумін може зв'язуватися з фосфоліпідами (зокрема фосфатидилхоліном) шляхом утворення нековалентних адуктів. Власне, формування цих куркумін-фосфоліпідних комплексів може посилити фармакокінетику куркуміну шляхом стабілізації при кишкових значеннях рН та захистити куркумін від гідролітичного руйнування [24]. Майті та ін. [136] повідомили, що куркумін-фосфоліпідний комплекс покращує біодоступність куркуміну при пероральному прийомі порівняно з суспензією куркуміну до п'яти разів. В іншому дослідженні результати *in vivo* споживання фосфоліпід-куркумінового комплексу щурами показали, що біодоступність була значно більшою порівняно з вільним куркуміном. Крім того, результати фармакокінетичних досліджень показали, що фосфоліпідно-куркуміновий комплекс дав значно вищі концентрації в плазмі та виявився більш стабільним порівняно з вільним куркуміном [128]. Таким чином, можна зробити висновок, що комплекс фосфоліпідів і куркуміну є одним із перспективних методів для того, щоб зробити куркумін більш стабільним і покращити його біодоступність [214].

Таким чином можна підсумувати, що доставка куркуміну в екзосомах є ефективним способом підвищення його біодоступності та навіть може забезпечити адресну доставку до клітин-мішеней. З іншого боку, отримання та упаковка куркуміном екзосом та стандартизація цього процесу залишає поле для наукової діяльності у пошуках нових способів підвищення біодоступності куркуміну [98, 99, 163]

1.3.3. Комплексоутворення куркуміну з протеїновими наночастинками

Перетворення речовини зі стандартної форми на нанорозмір є одним з ефективних способів для отримання певних специфічних характеристик матеріалу [58]. Крім того, утворення наноконкомплексів куркуміну з біополімерами (наприклад, протеїнами) забезпечує спосіб інкапсуляції куркуміну, що захищає його від окиснення та швидкого метаболізму. В першу чергу куркумін може утворювати комплекси з носіями за допомогою утворення гідрофобних взаємодій. Водневі зв'язки додатково можуть сприяти утворенню наноконкомплексів [232]. Технологічно сам процес наноконкомплексування є простим розчиненням куркуміну у відповідному розчиннику, такому як етанол, а потім додовання отриманої системи до розчину протеїну. Отриману суміш перемішують для утворення наноконкомплексів. Останнім етапом є цинтрифугування для вилучення вільного куркуміну. Куркумін-протеїнові наноконкомплекси можуть бути використані у вигляді дисперсного розчину або ж перетворюються на порошки шляхом заморожування для подальшого використання [145, 146]. Окрім значного зростання розчинності куркуміну (зокрема, при утворення наноконкомплексів з протеїном сої, розчинність куркуміну зросла у 812 разів [232]) наноконкомплекси призводять до підвищення стабільності куркуміну та його антиоксидантної активності [123].

Комплексоутворення з протеїнами є перспективною технікою для збільшення біодоступності та розчинності куркуміну у водних розчинах і може покращити несприятливі фармакокінетичні властивості куркуміну, а також сповільнити його окиснення [145]. Носії на сонові протеїнів посіли своє місце в галузі застосування наночастинок в біомедицині [40]. Сам процес утворення куркумін-протеїнового комплексу відбувається за наступною схемою. Спочатку гідрофобний за своєю природою куркумін змішується з амфіфільним білком у водному середовищі, в результаті чого в структурі протеїну розпочинається процес «автофолдингу» - внутрішня гідрофобна

частина протеїна захоплює гідрофобний куркумін, утворюючи ядро комплексу, тоді як гідрофільна частина протеїна утворює поверхню комплексу. Таким чином утворюється міцелярна структура [21]. Численні дослідження демонструють підвищення розчинності та біодоступності куркуміну у комплексі з різноманітними протеїнами-носіями, зокрема казеїном [168], бичачим сироватковим альбуміном [31] або з протеїнами рослинного походження, такими як ізолят протеїна соняшнику (*Helianthus L*) [215], протеїн маш (*Phaseolus radiatus*) [146] і соєвий протеїн (*Glycine max*) [40]. У всіх представлених дослідженнях протеїни рослинного походження мають високу здатність до комплексоутворення з нерозчинним у воді куркуміном за рахунок наявності гідрофобних сайтів та покращують його стабільність та розчинність у водному середовищі. Протеїни, екстраговані з молока (сироваткові протеїни та казеїн) [60] також мають властивість використовуватися як носії гідрофобних молекул або іонів [183]. Саїни, які містяться в натуральному молоці у вигляді супермолекулярних агрегатів (казеїнових міцел), є основними молочними протеїнами та мають виражені емульгувальні властивості, а також здатні до гелеутворення та зв'язування води [93]. Куркумін зазвичай зв'язується з казеїном у молоці; тим не менш, сироватковий протеїн також відіграє важливу роль у афінності зв'язування [168]. Сироватковий протеїн зустрічається в трьох формах: концентрат, ізолят та гідролізований протеїн. Концентрат складається з 80% протеїну і 20% жиру і цукру (вуглеводи, лактоза), тоді як ізолят містить понад 90% протеїну [181] і походить від процесів ультрафільтрації та діалізації під час виробництва сиру [102]. Основними складовими ізоляту є глобулярні протеїни, такі як бета-лактоглобулін, альфа-лактальбумін і бичачий сироватковий альбумін [176]. Завдяки своїм поживним властивостям і різноманітним технологічним функціональним можливостям сироваткові протеїни широко використовуються в різних харчових продуктах і як кілька видів носіїв систем терапевтичних та поживних сполук [158]. Беручи до уваги кілька факторів, наприклад, концентрацію первинного протеїну, температуру та рН, при яких

відбувається процес, а також іонна сила, сироваткові протеїни можуть приймати різні структури, наприклад, агрегати у формі нанофібрил/трубок/частинок, гнучких волокоок та мікрогелей [4]. З цього класу протеїнів, зокрема β -лактоглобулін, має здатність до самозбирання, утворюючи нанофібрилярні агрегати довжиною від 1 до 10 μm із діаметром у нанодіапазоні (1–10 нм) шляхом тривалої термічної обробки в екстремально кислих. умовах (рН приблизно 2) і малою іонною силою [156]. Нанофібрили сироваткового протеїна мають підвищені техніко-функціональні характеристики порівняно з нефібрильними. Вони мають здатність створювати самопідтримувані гідрогелі при невеликих концентраціях протеїна, мають чудові емульгуючі та піноутворювальні характеристики, а також мають більшу здатність збільшувати в'язкість [17]. Коли куркумін утворює комплекс з нанофібрилами (рН 3,2), його розчинність у воді значно зростає, тоді як осадження з часом зменшується.

Інший спосіб транспортування куркуміну полягає у виготовленні емульсії, насиченої куркуміном, отриманою з протеїнів або полісахаридів, таких як соєві вуглеводи або казеїн, сироватковий протеїн, аравійська камедь, лецитин, твін-80, тощо [140]. На жаль, ці комплекси виявилися не дуже стійкими, оскільки вони розпадаються з часом, що негативно впливає на їх зберігання [267]. У недавньому дослідженні Ye зі співавторами [263] було продемонстровано, що коливання конформації сироваткового ізоляту внаслідок десольватації можна підтримувати шляхом леофілізації. Таким чином, було продемонстровано, що такі протеїни, як казеїн, овотрансферин, ізолят сироваткового протеїну, наногель сироваткового протеїну та казеїну демонструють ймовірні властивості для стабілізації емульсії куркуміну, і при комплексоутворенні збільшується гідрофобна поверхня, що призводить до значного збільшення розчинності утворених комплексів, що є важливим під час кишкового всмоктування [26].

Сироваткові протеїни мають здатність утворювати гідрогелі холодного твердіння. Техніка холодного гелеутворення включає дві послідовні стадії:

отримання розчинних агрегатів шляхом нагрівання розчину протеїну з подальшим охолодженням отриманого розчину з наступним холодним гелеутворенням, що індукуються підвищеною клонцетроцією солі (додавання CaCl_2 і NaCl) або додаванням глюконо-D-лактону [9]. Порівняно з гелями, що затверджуються при нагріванні, гелі холодного затвердіння мають здатність транспортувати чутливі до температури біопрепарати, такі як тіамін (вітамін B1) і пробіотики. Так, у недавньому дослідженні була спроба виготовлення змішаного гідрогелю, що складається з агрегатів сироваткового протеїну та карагіннану, для захисту куркуміну у верхньому відділі шлунково-кишкового тракту і транспорту його до товстої кишки. Така комбінація речовин дозволила досягти високої концентрації куркуміну і, разом з тим, запобігти втраті куркуміну впродовж його шляху до товстої кишки [75].

Прийнято вважати β -лактоглобулін, сироватковий протеїн, однією з найкращих природних полімерних матриць завдяки своїй дивовижній поживній цінності, потужній афінності зв'язування та стійкості до гідролізу пепсином, що може зробити його одним із основних векторів доставки терапевтичних агентів [143]. β -лактроглобулін має 2 залишки триптофану (Trp 19, розташований у гідрофобній кишені, і Trp 61, розташовані на поверхні протеїна поблизу кишені [10]. β -лактоглобулін має компакту глобулярну структуру, завдяки чому він має високу стійкість до деградації в середовищі шлунку [233]. Молекули куркуміну можна легко з'єднати не тільки на поверхні протеїнів за допомогою простого методу комплексоутворення, але також можна включити у внутрішню частину протеїну, оскільки структура протеїну сильно залежить від pH середовища [77].

На сьогоднішній день існує шість протеїнів-носіїв, які мають офіційну ліцензію на використання як глікокон'югати. У сучасній фармакологічній практиці переважно використовуються правцевий анатоксин, дифтерійний анатоксин і перехресно-реактивний матеріал 197 (CRM197) [241]. CRM197 був вперше виділений у 1970-х роках і являє собою нетоксичний мутант дифтерійного анатоксину, який містить одне амінокислотне заміщення, G52E,

і, як відомо, має підвищену ефективність як протеїн-носій, оскільки він має багато перспективних сайтів зв'язування, а також не проявляє цитотоксичності щодо нормальних клітин організму [144]. CRM197 є поліпептидом з молекулярною масою 58 кДа, який може бути розщеплений трипсиноподібною протеазою на 2 субодиниці (фрагменти А і В), з'єднані дисульфідним зв'язком [153]. Субодиниця А є каталітичною субодиницею ~21 кДа, тоді як субодиниця В, ~38 кДа, містить два субдомени, один відповідальний за зв'язування з гепарин-зв'язувальним EGF-подібним фактором росту (HB-EGF), а другий — за транслокацію [50]. CRM197 використовувався як глікокон'югат для багатьох вакцин, перша з яких НвОС (HibTITER®; Wyeth Pharmaceuticals, Філадельфія, США) продемонструвала захист немовлят від захворювання, пов'язаного з *Haemophilus influenzae* типу b [84]. Інші приклади включають кон'юговані вакцини проти інвазивних пневмококових захворювань, менінгококових захворювань і черевного тифу [245].

Описані приклади використання CRM197 як універсального носія для багатьох кон'югованих вакцин дозволило нам зробити припущення щодо можливого утворення комплексів між куркуміном та CRM197, що потенційно може мати не лише ефект підвищення біодоступності самого куркуміну, а й можливий синергічний ефект щодо малігнізованих клітин. Власне, саме ця ідея і лягла в основу даної роботи.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. *Матеріали та обладнання*

2.1.1. *Реактиви*

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

У роботі використовували: нативний дифтерійний токсин (був наданий Інститутом біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України), дифтерійний анатоксин та $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ (ПАТ “Фармстандарт-Біолік”). K_2CO_3 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , HCl , H_2SO_4 , NaOH , KCl , NaCl , KH_2PO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaN_3 (Міранда-С, Україна), середовища для бактерій LB («Sigma», США), чашки Петрі, агар («Sigma», США), агароза («Sigma», США), IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Thermo Scientific), Ni^{2+} -NTA агароза (Qiagen, Німеччина), персульфат амонію, тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), акриламід, N, N' – метилен-біс-акриламід, β -меркаптоетанол, трицин («Sigma-Aldrich», США), додецилсульфат натрію (ДСН) («Sigma-Aldrich», США), BSA, сечовина («Sigma», США), бром феноловий синій, кумасі блакитний G-250, імідазол, трис(гідроксиметил)амінометан (Tris) («Sigma-Aldrich», США), люмінол, нітроцелюлоза («Amersham Biosciences», США), 3,3'-діамінобензидин тертрагідрохлорид (DAB), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), гліцерин, етиловий спирт, метиловий спирт, оцтова кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), хлорамфенікол, ампіцилін, канаміцин, глюкоза (Київмедпрепарат, Україна), параформальдегід, Mowiol-DABCO (1,4-дізабіцикло[2, 2, 2]октан), флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), Tween 20 («Sigma», США), трипановий синій, барвник для контрастування ядер Hoechst 33342, пропідій йодид, маркери для електрофорезу протеїнів, коктейль інгібіторів протеїназ (prod #1861279, Thermo Scientific), коктейль

інгібіторів фосфатаз (Thermo Scientific), моноклональні антитіла до Akt, Akt-P, NF- κ B, NF- κ B-P, EGFR, EGFR-P, Actin (Beckman Coulter, США), культуральні флакони та чашки для культури тканин (Greiner Bio One, Німеччина), середовище RPMI-1640 з L-глутаміном та індикатором, середовище DMEM, фетальна сироватка телят (FBS), пеніцилін, стрептоміцин, амфотеріцин, МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід) («Sigma-Aldrich», США), одноразовий лабораторний посуд (Delta Lab, Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Ультра чиста вода була отримана з використанням системи очищення води Adrona.

2.1.2. Обладнання

Камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), орбітальний шейкер-термостат ES-20, CO₂-інкубатор, ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), спектрофотометр GeneQuantoPro (Amersham Biosciences, США), шафа біобезпеки (Holten, Франція), мультилунковий рідер μ Quant ELx800 (BioTek, США), рН-метр PL-700AL (EZODO, Тайвань), мікроцентрифуга A-14 (Joan, Франція), аналітичні ваги WAA 210/C/1 (Salex, Данія), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), протоковий цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США), лічильник клітин Countess II FL (Thermo Scientific), мас-спектрометр MALDI-TOF Voyager DE Pro (Applied Biosystems, USA, серійний номер 6393), мультилунковий спектрофотометр з вертикальним потоком світла (ASYS Expert 96, Австрія).

2.1.3. Лабораторні тварини, культури клітин евкаріот, експресійні штами бактерій та вектори, що були використані у дослідженні

В експериментах використовували наступні клітинні лінії евкаріот: MDA-MB-231 (ATCC номер HTB-26) – клітини аденокарциноми грудної залози людини, A431 (ATCC номер CRL-1555) – клітини епідермальної карциноми людини, суспензійні клітини Jurkat (ATCC номер TIB-152) -

іморталізована лінія клітин Т-лімфоцитів людини, активовані В-клітини людини 4BL, MDA-MB-231 та A431 були отримані з колекції клітин інституту Біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Клітинна лінія 4BL була люб'язно надана професором Любов Лукаш з інституту Молекулярної біології та Генетики НАН України [6, 131].

Бактерійні клітини *E.coli* штам BL21 (DE3) Rosetta (Novagen, США).

Плазмідні вектори для експресії протеїнів в прокаріотичній системі експресії pET-24a(+).

Всього в експериментальних дослідженнях було використано 49 мишей Mus musculus лінії BALB/c розведення віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України, самиці віком 6-8 тижнів та вагою 18-23 г. Тварини утримувались за стандартних умов щодо освітлення (12/12), температури (20-23° С) та вологості (30-35%) в акредитованому віварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Всі маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–III Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.) і узгоджених з положеннями директиви Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» від 24 листопада 1986 р.

2.1.4. Програмне забезпечення

Аналіз електрофореграм – TotalLab Quant, зображень з конфокального мікроскопу – FIJI, обробка даних з протокового цитофлуориметра – FCS Express v3.0 та Flowing Software 2.5.1. Побудова графіків і діаграм – Origin 8.0 та Microsoft Excel (Microsoft corporation, США). Створення і упорядковування

рисунків – Adobe Photoshop CS5 2014 та CorelDraw 2018. Розрахунок IC_{50} проводили за допомогою Quest Graph™ IC_{50} Calculator." AAT Bioquest, Inc., 7 Jun. 2023, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> Оформлення дисертаційної роботи – Microsoft Word згідно правил та рекомендацій наказу №40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій».

2.2. *Методи*

2.2.1. *Дослідження потенційних сайтів сорбції куркуміну з протеїнами in silico*

Протеїнові структури CRM197 (5I82) і BSA (2VUE) отримали з Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) і підготували в програмному забезпеченні Chimera. Лігандні структури були побудовані у Marvin Sketch software (програмне забезпечення для створення ескізів) . Потім ліганди протонували та генерували в низькоенергетичних конформаціях (MarvinSketch версія 21.16.0, ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>). Молекулярне моделювання з'єднання протеїну та ліганду виконали за допомогою веб-сервера SwissDock, який використовує програму з'єднання протеїн-ліганд EADock DSS v3 [72]. Використовували простір пошуку $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$ із сіткою, центрованою на сайтах зв'язування. Крім того, був обраний точний тип з'єднання з параметрами за замовчуванням.

2.2.2. *Експресія рекомбінантних похідних дифтерійного токсину в прокаріотичній системі експресії E.coli*

Для отримання конструкції, яку використовували для трансформації бактерійних клітин, ампліфікований ген цільового протеїну об'єднували з вектором експресії *E.coli* pET24a (+) із використанням сайтів рестрикції BamHI и XhoI [96, 117]. Бактерійну культуру клітин *E.coli* BL21 Rosetta, яка містить в собі плазмідну ДНК з вбудованим цільовим геном фрагменту ДТ, культивували на середовищі LB Broth із 50 мг/л канаміцину при 37°C та постійній аерації (250 об/хв) впродовж ночі. З нічної культури відібирали 5-10 мл та вносили у свіже середовище для нарощування клітинної біомаси та

культивували впродовж 2 годин при 37°C та постійній аерації (250 об/хв). Відбирали аліквоту та вимірювали OD при $\lambda=600$ нм, після того як даний показник знаходився в межах 0,3-0,5, додавали індуктор експресії протеїну – ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозидом (IPTG) в концентрації 1 мМ. Цільові протеїни синтезували впродовж 3-4 годин при 30°C в умовах сильної аерації (250 об/хв). Всі вище перераховані маніпуляції проводили в стерильних умовах. Далі проводили центрифугування отриманої суспензії при 3600 об/хв впродовж 15 хвилин.

2.2.3. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метало-афінної хроматографії з використанням Ni-NTA-агароза та їх аналіз

Очищення протеїнів проводили за допомогою методу метало-афінної хроматографії на Ni^{2+} -NTA агарозі. Клітинний осад ресуспендували в буферному розчині – Wash Buffer (50 мМ Na_2HPO_4 (pH 8,0), 0,5 М NaCl), який містить 6М сечовину. За допомогою ультразвукового дезінтегратора Labsonic (Sartorius, Germany) обробляли на льоду отриманий розчин (3×20 циклів ультразвукової дезінтеграції) та центрифугували 20 хвилин при 13400 об/хв. Надосадову рідину наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, Germany), попередньо врівноважену 10-15 об'ємами буферу для промивання (50 мМ Na_2HPO_4 (pH 8,0), 0,5 М NaCl, 6 М сечовина). Далі промивали колонку 10-15 об'ємами буферу для промивання з 6 М сечовиною. Після цього знову промивали колонку Wash Buffer із додаванням 6 М сечовини та імідазолу в концентрації 10 мМ. Елюцію очищених протеїнів проводили в буфері з додаванням 6 М сечовини та імідазолу в концентрації 250 мМ. Після очищення отриманий розчин рекомбінантного протеїну піддавали діалізу проти фосфатно-сольового буферу (PBS) (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4 , 0,024% KH_2PO_4 , pH 7,4), впродовж ночі при 4°C, при постійному перемішуванні та із зміною буферу.

Чистоту та концентрацію цільових протеїнів в отриманих зразках оцінювали за допомогою методу ДСН-ПААГ електрофорезу. Молекули

протеїнів розділяли в 10% поліакриламідному гелі в Tris буферній системі із застосуванням електрофоретичної системи Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Фарбування гелю здійснювали за допомогою Coomassie Brilliant Blue G-250. Концентрацію протеїну визначали денситометрією із використанням спеціальної комп'ютерної програми Fiji.

2.2.4. Отримання комплексів куркуміну з протеїнами

Куркуміну розчиняли у 96% етанолі (5 мг/мл). Потрібну кількість куркуміну додавали до отриманої кількості протеїна (CRM197, SbB або BSA) у розчині PBS (pH 7,4) для досягнення молярних співвідношень 1:20 протеїн:куркумін. Куркумін, розведений у PBS при необхідній концентрації та співвідношенні розчинника, використовували як контроль. Сформовані комплекси діалізували у PBS, за допомогою PVDF діалізного мішка (Sigma-Aldrich, США).

2.2.5. Характеристика отриманих комплексів за зміною спектру поглинання

Спектр поглинання комплексів отримували методом спектрофотометрії з використанням Optizen -POP (Optizen, Корея). Вимірювання проводили проти розчину PBS (pH 7,4). Куркумін (5 мг/мл розчину в 96% етанолі), розчинений у PBS, використовували як контроль, коли ми досліджували спектральні властивості комплексів куркуміну як з BSA, так і з CRM197.

2.2.6. Культивування культур клітин

Клітини A431 культивували на поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, що містило 10% фетальної сироватки телят, стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотеріцин В (250 мкг/л) за 5% CO₂ в атмосфері. Клітини MDA-MB-231 та 4BL культивували на середовищі DMEM, що містило 10% фетальної сироватки телят, стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотеріцин В (250 мкг/л) в атмосфері 5% CO₂. Культуру клітин культивували на чашках петрі, в 5% атмосфері CO₂ при 37 С.

Культивування *E.coli* проводили наступним чином: 20 мкл стоку бактерій додавали до, 20 мл LB, що містило 10 мг канаміцину, та інкубували за 37°C впродовж 24 години. Отриманий інокулят додавали до 250 мл LB з 125 мкл канаміцину. Колбу ставили на шейкер 250 обертів, 37°C, на 2 години, після додали ППТГ до концентрації 0,1 мМ та продовжили мішати знизивши температуру до 30°C ще 3 години. Після культивування розлили розчин у пробірки та центрифугували за 3600 об/хв. Впродовж 15 хвилин. Видалили супернатант, бактерії помістили у фризер на - 70°C.

2.2.7. Аналіз життєздатності клітин за допомогою MTT тесту

MTT тест базується на визначенні дихальної активності клітин. MTT (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід) розкладається метаболічно-активними клітинами до кристалів формагану фіолетового кольору, кількісний вміст якого можна вимірювати за допомогою спектрофотометричних методів, розчинивши їх у літичному буфері.

Для дослідження цитотоксичного впливу куркуміну та його комплексів клітини ліній A431, MDA-MB-231 та 4BL висівали у 96-лункові планшети з розрахунку 50000 клітин на лунку, додавали до них контрольний протеїн (BSA), CRM197 та SbB у розрахунку на кінцеву концентрацію у лунці 0,1 μ M. Також додавали куркумін, розчинений у PBS до досягнення кінцевої концентрації 2 μ M та комплекси усіх вищезгаданих протеїнів з куркуміном інкубували 12 год. Для розрахунку напівлетальних доз (IC_{50}) для куркуміну попередньо нарощені клітини ліній MDA-MB-231 інкубувалися в середовищі з концентраціями куркуміну 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ. Для визначення IC_{50} рекомбінантних нетоксичних похідних ДТ клітинні лінії A431 та MDA-MB-231 інкубували в середовищі з додаванням нативного ДТ, CRM197 та SbB у концентраціях від 0,01 мкМ до 1 мкМ. Проби інкубували протягом 24 год, 37°C, 5% CO₂.

Життєздатність клітин визначали за допомогою MTT-тесту, як описано у [150]. Середовища в лунках, в якому проходило інкубування, замінювали на нове з додаванням MTT-реагенту (Sigma, США) у кінцевій концентрації 0,5

мг/мл, згідно рекомендацій виробника та інкубували 3 год. Після цього розчин МТТ-реагенту замінювали на лізуючий розчин наступного складу для розчинення утворених кристалів формазану: 10% SDS, 0,6% оцтової кислоти у диметилсульфоксиді (ДМСО) та визначали його оптичне поглинання на мультилунковому рідері μQuant ELx800 (BioTek, США) мікропланшетному на 630 нм, проти 545 нм. Результати цього тесту отримані в шестикратних повторях.

Розрахунок IC_{50} проводили за допомогою програми Quest Graph™ IC_{50} Calculator." ААТ Bioquest, Inc., 7 Jun. 2023, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>. За результатами ітеративного моделювання оптимальним рівнянням, яке описує експериментальні точки, було отримано трипараметричне рівняння сигмоїдальної дозозалежної кривої:

$$y = min + \frac{max - min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$$

де x – концентрація куркуміну (або його протеїнових комплексів), який інгібує ріст клітин, y – кількість життєздатних клітин за x концентрації куркуміну або комплексів, min – життєздатність клітин без впливу інгібітора росту, max – життєздатність клітин за максимальної концентрації інгібітора росту, IC_{50} – напівтолксична доза.

2.2.8. Визначення ефективності взаємодії з поверхнею клітин ссавців куркуміну та його протеїнових комплексів

Клітинні лінії A431 та MDA-MB-231 після інкубування впродовж 48 годин промивали 3 мл PBS×1. Після промивання додавали розчин 11,4 мл PBS×1 з 600 мкл ЕДТА (0,5 М) для інкубації впродовж 15 хвилин у термостат при 37°C. Клітини відкріплювалися від плашки і виходили у розчин, при цьому рецептор proHB-EGF залишався неушкодженим. За допомогою лічильника клітин Countess II FL рахували кількість клітин. Отримали 9 млн кл/мл для A431 та 8 млн кл/мл для MDA-MB-23. В кожную пробу з стоку було додано 100 мкл клітин. Вносили такі зразки: куркумін 2 мкМ, BSA 0.1 мкМ, куркумін-

CRM197 (1:20), куркумін-SbB (1:20). Після провели інкубацію 30 хвилин у термостаті 37°C. Наступним етапом відкручували пробирки на центрифугі 15 секунд 13,4 g, відбирали супернатант і до осаду додали 1 мл PBS. Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з аргонним лазером (фіксована збуджуюча довжина хвилі – 488 нм) на основі використання таких параметрів: пряме (мале кутове) світлорозсіювання та бічне світлорозсіювання, а також інтенсивність флуоресценції за каналами FL1 (515-535 нм).

2.2.9. Дослідження шляху загибелі клітин з використанням набору Аннексин V та пропідій йодиду

Для дослідження механізму загибелі клітин використовували рекомбінантний протеїн Аннексину V, мічений флуоресцентною міткою FITC, який є Ca^{++} залежним протеїном, що специфічно взаємодіє з фосфатидил серином [47] та пропідій йодид (PI), що є флуоресцентним ДНК інтеркалятором з максимальною довжиною хвилі поглинання 520 нм та максимумом флуоресценції 600 нм, інтенсивність флуоресценції якого збільшується у 20 разів при взаємодії з ДНК.

Для визначення рівня апоптозу та некрозу клітинні лінії A431 та MDA-MB-231 інкубували у 6-луночковій планшеті впродовж 24 годин з розрахунку 500000 клітин на луку. Після попередньої інкубації клітин до них вносили відповідні дози куркуміну або його комплекси з протеїнами та інкубували ще 12 годин. Були внесені зразки: куркумін 2 мкМ, BSA 0.1 мкМ, PBS, куркумін-CRM197 (1:20), куркумін-SbB (1:20). Після чого клітини осаджували за 300g 10хв, та їх середовище змінювали на 500 мкл розчину 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 з додаванням 10 мкг рекомбінантного Annexin V-FITC та 6 мкг PI. Клітини інкубували 15 хв за температури 4°C. Аналіз зразків проводили на протоковому цитофлуориметрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з аргонним лазером (фіксована збуджуюча довжина хвилі – 488 нм) на основі використання таких параметрів: пряме

(мале кутове) світлорозсіювання та бічне світлорозсіювання, а також інтенсивність флуоресценції за каналами FL1 (515-535 нм) та FL3 (610-630 нм).

2.2.10. *Дослідження інтерналізації куркуміну малігнізованими клітинами*

Для аналізу проб на конфокальному мікроскопі клітини A431, вирощені на скельцях, промивали двічі по 1 мл PBS. Для аналізу ефективності інтерналізації куркуміну та його комплексів з протеїнами додавали куркумін 2 мкМ та комплекси куркумін-SbB (1:20) та інкубували впродовж 5 годин. В якості барвника клітинних ядер використовували Hoechst 33342, який додавали одночасно з частками до концентрації 10 мкМ у середовищі. Інкубацію проводили протягом 60 хв. при 37°C та 5% концентрації CO₂ у середовищі. Після чого промивали клітини двічі по 1 мл PBS та додавали розчин 4% параформальдегіду у 0,1М Na-фосфатному буферному розчині з метою фіксації клітин, інкубували 40 хв. при 4°C. Далі двічі відмивали незв'язаний параформальдегід розчином PBS та останній раз дистильованою водою. На скельця наносили по 25 мкл розчину MOVIOL/Dabco, що сповільнював вигорання флуорофора та стабілізував клітини, та фіксували покривне скло з клітинами на предметному склі. Для визначення часових меж інтерналізації куркуміну та його комплексів з протеїнами додавали куркумін 2 мкМ та комплекси куркумін-SbB (1:20) у попередньо нарощені клітини у 12-лунковому планшеті. Проводили прижиттєве конфокальне сканування з різною часовою експозицією (2 хв, 15 хв, 90 хв).

Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta окремо за трьома каналами: збудження – 405 нм, детекція – 420-480 нм – флуоресценція Hoechst 33342; збудження – 467 нм, детекція – 505-580 нм – флуоресценція куркуміну; збудження – 543 нм, детекція – від 560 нм – автофлуоресценція клітин.

2.2.11. Імунізація мишей фрагментами нетоксичного похідного ДТ та забір сироваток

У ході даної експериментальної роботи досліджували рекомбінантні протеїни прокаріотичного походження, тому ми використали стандартним графіком імунізації, який був розроблений для самок мишей BALB/c, віком 6-8 тижнів, за яким Аг (25-50 мкг розведений в PBS) та обраний ад'ювант, у співвідношенні 1:1, вводили інтраперитонеально. Максимальний об'єм на одну тварину становив 0,2 мл [11, 101].

Імунізацію мишей проводили за схемою, яка включала в себе трикратне введення протеїнового розчину дозою 25 мкг/мишу з додаванням ад'юванту (алюміній гідроксид $Al(OH)_3$, впродовж шести тижнів з двотижневими перервами. За схема вводили 0,1 мл розчину рекомбінантного протеїну та ад'юванту у співвідношенні 1:1 внутрішньочеревним способом. Введення здійснювали в нижній правий квадрант живота. Використовували голки діаметром 22G.

Зразки крові ($V \sim 50$ мкл) відбирали на 14-й, 28-й та 42-й день імунізації, із хвостової вени. Відібраний матеріал, без додавання антикоагулянтів, інкубували протягом 40 хвилин при кімнатній температурі і центрифугували протягом 30 хв за 2700 об/хв.

2.2.12. Визначення рівня антитіл до нетоксичних рекомбінантних похідних ДТ в сироватці крові імунізованих мишей методом ELISA

В лунки 96-лункового плоскодонного планшету наносили антиген з кінцевою концентрацією 3 мкг/мл, у фосфатно-сольовому буфері (PBS – (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4 , 0,024% KH_2PO_4 , pH 7,4) та залишали на ніч при температурі 4°C. Для видалення антигену, який не абсорбувався, планшет відмивали 3 рази PBS. В якості блокуючого агента використовували знежирене 1% молоко в PBS та інкубували при 37°C впродовж 60 хвилин. Зразки досліджуваної сироватки крові мишей розводили в співвідношенні 1:100 в PBS-T (PBS з Tween-20 в кінцевій концентрації 0,04%). Інкубацію з

первинними АТ проводили впродовж 1 год. Далі планшет відмивали PBS-T) для видалення неспецифічно зв'язаних АТ. Для виявлення первинних АТ в лунки планшету вносили антивидовий кон'югат anti-mouse Ab (Sigma-Aldrich, США) в PBS-T у співвідношенні 1: 12000 та інкубували при 37°C впродовж 60 хвилин. Повторювали процедуру відмивки для видалення незв'язаних продуктів реакції та вносили в лунки по 0,1мл розчину хромогенного субстрату ТМВ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин) та інкубували планшет 10-15 хв при кімнатній температурі в темному місці. Для зупинки реакції в лунки планшета додавали по 0,05мл розчину 2 М сірчаної кислоти. Результати ІФА обраховували за допомогою мультилункового спектрофотометра з вертикальним потоком світла (ASYS Expert 96, Австрія) при довжині хвилі 450 нм (референта – 630 нм).

2.2.13. Визначення вмісту сигнальних протеїнів та їх активності методом ELISA

Навантажені куркумін-протеїновими комплексами клітини через 24 год інкубації звільняли від старого середовища та промивали PBS та за допомогою шкребка механічно збирали клітини з дна чашки Петрі в 1 мл холодного PBS. Отриману суспензію клітин центрифугували 5 хвилин при 4°C. Осад ресуспендували в RIPA буфері (Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ хлориду натрію, 1 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA), 1% NP-40, 1% дезоксихолевої кислоти натрію, 0,1% додецилсульфат натрію (SDS), 1 мМ фенілметилсульфонілфторид та інгібітори протеаз). Суспензію клітин соніфікували 2 рази протягом 30 секунд на 50% потужності приладу на льоді. 15 хвилин суспензію витримували на льоду, періодично перемішуючи. Після інкубації центрифугували 3600 об/хв впродовж 15 хв для осадження клітинного дебрису. Супернатант викорисовували для визначення сигнальних протеїнів.

У плоскодонний 96-лунковий планшет наносили по 100 мкл клітинних лізатів у розведенні 1:100, які виступають у ролі антигену. Інкубували

протягом години при 37°C з подальшою трикратною відмивкою дистильованою водою. Як блокуючий агент обрали 1% розчин знежиреного молока в PBS, яке інкубували годину при 37° з подальшим трикратним відмиванням. Первинні антитіла, розведені у співвідношенні 1:1000 з PBS-T (PBS з Tween-20 в концентрації 0,05%) інкубували 12 годин при 4°C з подальшим трикратним відмиванням. Проявочні антивидові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, розчиняли у PBS-T в співвідношенні 1:8000. Інкубували 60 хвилин при 37°C, після чого трикратно промивали. Для проявки результатів у кожен лунку додавали по 100 мкл хромогенного субстрату ТМВ. Після 10-15 хвилинної інкубації при кімнатній температурі реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 2 М розчину сірчаної кислоти. Результати фіксувалися за допомогою мультилункового спектрофотометра з вертикальним потоком світла при довжині хвилі 450 нм, проти 650 нм.

2.2.14. Аналіз пороутворювальних властивостей протеїнів

Для дослідження пороутворюючих властивостей CRM197 на мембрану, використовували БЛМ, створені з розчину комерційних препаратів ФЕА і ФХ, суміш яких розчиняли в н-гептані у співвідношенні 1:1 при загальній концентрації ліпідів 20 мг/мл. Отриманий в результаті розчин ліпідів наносили на отвір у тефлоновому стаканчику (об'єм 1 мл) з діаметром 0,6 мм або дельриновому стаканчику (об'єм 1мл) з діаметром 0,15 мм. Формування ліпідного бішару контролювали візуально у відображеному світлі за допомогою бінокулярного мікроскопа. Водно-сольовий розчин, що омивав мембрану, містив 10 мМ Tris-HCl (pH 6,0 або 4,8) та задану кількість хлориду калію. Різниця потенціалів прикладалась до мембрани від джерела напруги, що дозволяло отримувати постійну (від -150 мВ до 150 мВ) або лінійно змінювану напругу зі швидкістю 60 мВ/хв, використовуючи той самий діапазон амплітуд. Напругу, прикладену до мембрани, контролювали за допомогою цифрового вольтметра. Оточуючий мембрану водно-сольовий розчин перемішували за допомогою магнітного шейкера. Експерименти проводили при кімнатній

температурі (20 – 24°C). Провідність потенціалзалежних іонних каналів, утворених в присутності CRM197 в присутності солей тіазолію (8 (R = C₈H₁₇) (ОМГТ), 9 (R = C₉H₁₉) (НМГТ), 10 (R = C₁₀H₂₁) (ДМГТ) 12 (R = C₁₂H₂₅) (ДДМГТ): 1 – виміри у симетричних 1 М КСl (pH_{cis} 6.0/pH_{trans} 6.0) системах, 2 – виміри у несиметричних системах (pH_{cis} 4.8/pH_{trans} 6.0). Комплекси солей тіазолію з CRM197 готували за кімнатної температури. Перед додаванням до системи БЛМ таклітинних ліній комплекси експонували протягом 30 хвилин.

2.2.15. Статистична обробка отриманих результатів

Дані були статистично опрацьовували за допомогою програмного забезпечення МО Excel, Origin 9.0 та Fiji. Для порівняння отриманих даних в дослідних групах, використовували критерій Стюдента. Різниця вважалась статистично достовірною при $P < 0,05$. використали коефіцієнтом кореляції Пірсона (r), який є показником кореляції (лінійної залежності) між двома змінними x_k, y_k та набуває значень від -1 до +1 включно. Значення +1 означає, що залежність між x_k, y_k є лінійною і відображає зростання Y при зростанні X . Значення -1 – відображає зменшення Y при зростанні X . Якщо коефіцієнт кореляції Пірсона дорівнює 0, то лінійної кореляції між змінними немає [199]. Значення даного параметру обраховується за формулою:

$$r_{P,xk,yk} = \frac{\sum (x_k - M_x)(y_k - M_y)}{\sqrt{\sum (x_k - M_x)^2 \sum (y_k - M_y)^2}}$$

$$M_x = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_k, \quad M_y = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n y_k,$$

де $r_{p,xk,yk}$ – коефіцієнт кореляції Пірсона, M_x, M_y – оцінки математичного очікування випадкових величин, n – обсяг вибірки.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Одержання комплексів куркуміну з нетоксичними рекомбінантними похідними дифтерійного токсину та їх характеристика

3.1.1 Характеристика сайтів сорбції куркуміну з похідними дифтерійного токсину

Дифтерійний токсин (ДТ) – основний фактор патогенності бактерії *Corynebacterium diphtheria*, який проявляє себе як сильний екзотоксин, що пригнічує синтез протеїну у чутливих до нього еукаріотичних клітинах. Типово для більшості бактерійних токсинів, ДТ складається з двох частин: субодиниця А (sbA) – має тип структурного мотиву $\alpha + \beta$ та є каталітичним доменом та субодиниця В (sbB), що складається з двох доменів – трансмембранного та рецепторного. Трансмембранний домен складається з дев'яти α -спіралей, дві пари яких неполярні і можуть брати участь у вставці і транслокації, викликані рН-активацією. Домен, що зв'язує рецептор, за будовою є сплющеним β -циліндром. Третинну структуру токсину формують такі домени: R (англ. receptor binding), C (англ. catalytic), T (англ. transmembrane). sbA сформована Nкінцевим C доменом, який виконує каталітичну функцію. sbB складається з доменів – T і R, які виконують функції транслокації токсину в клітину та зв'язування з рецептором на поверхні чутливої клітини, відповідно [46]. Дифтерійний токсин є добре відомим бактерійним фактором патогенності, що має високий рівень спорідненості до клітинного рецептора proHB-EGF (гепарин-зв'язуючий EGF-подібний фактор росту), асоційованого з багатьма пухлинними клітинами [81, 161]. Його взаємодія з рецептором характеризується високими показниками специфічності та афінності, яку можна порівняти із сильною взаємодією антиген-антитіло (константа дисоціації для комплексу ДТ з HB-EGF складає близько 10^{-8} - 10^{-9} М [129]. Оскільки ДТ є надзвичайно небезпечним, доцільно проводити роботу не з самим токсином, а з його аналогами – нетоксичними похідними що зберігають рецептор-зв'язувальну активність.

CRM197 є рекомбінантним нетоксичним похідним ДТ, який відрізняється від нативного токсину лише однією заміною в амінокислотній послідовності каталітичного домену (рис. 3.1). CRM197 отримують шляхом заміни гліцину в позиції 52 гена ДТ на глютамінову кислоту [69, 221]. Ця заміна призводить до втрати каталітичної активності С-доменом і втрати цитотоксичності цілою молекулою CRM197 [137]. Незважаючи на втрату токсичності, молекула CRM197 зберігає незмінними всі структурні компоненти, властиві молекулі ДТ [53], включаючи структури, відповідальні за зв'язування R-домену з клітинним рецептором.

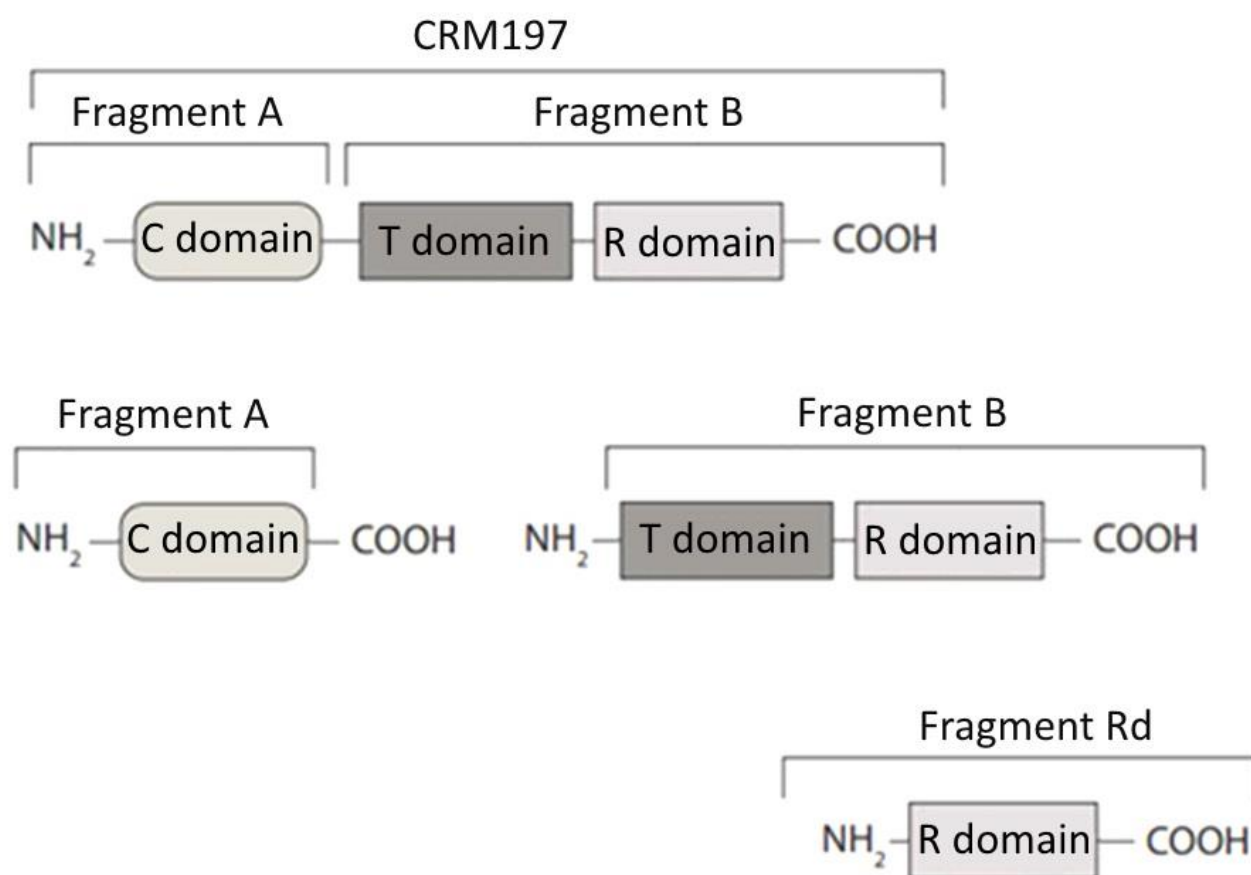


Рис. 3.1. Схема будови нетоксичного похідного дифтерійного токсину CRM197 та його фрагментів SbA, SbB та Rd.

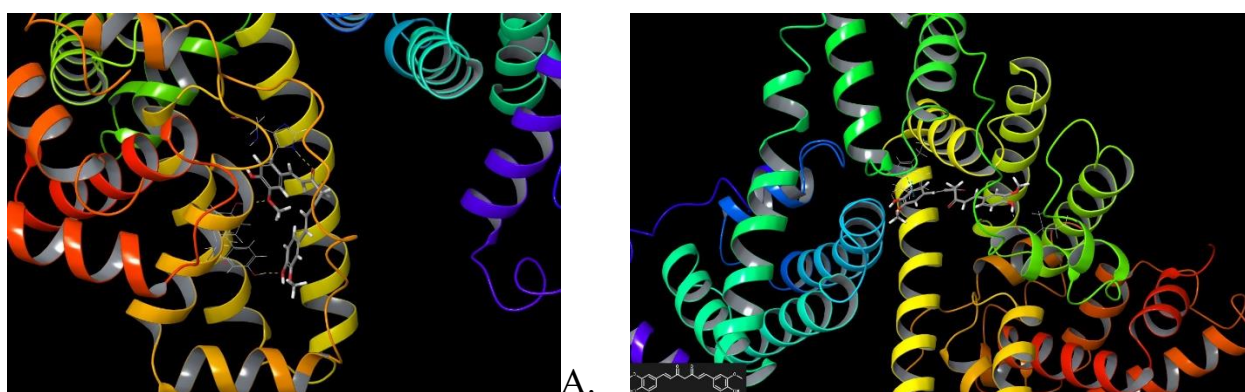
Нетоксичне рекомбінантне похідне дифтерійного токсину має протипухлинний вплив на деякі типи пухлинних клітин, зокрема показано, що CRM197 блокує проліферацію і ангіогенез та індукує апоптоз в клітинах аденокарциноми SW-13 та H295R людини в культурі та на мишачих

ксенотрансплантатах [139]. Окрім того, показано, що CRM197 є перспективним носієм для багатьох лікарських препаратів, таких як паклітаксел [231], доксирубіцин [110], цисплатин [252]. Все це робить CRM197 перспективним можливим носієм для куркуміну, який може не тільки підвищити біодоступність самого куркуміну, а й мати синергічний вплив на пухлинні клітини. Таким чином, першим етапом нашої роботи було дослідження *in silico* можливих сайтів з'єднання молекули куркуміну з молекулою CRM197.

Метод молекулярного докінгу, що виконувався за допомогою програмного забезпечення SwissDock дозволив зробити ряд припущень щодо можливих сайтів зв'язування та формування стійких комплексів молекули куркуміну з молекулою BSA та CRM197 [272].

Дослідження комплексоутворення BSA і куркуміну показало існування двох можливих сайтів зв'язування (рис. 3.2 А, В). Відповідно до першого сайту зв'язування куркумін утворює водневі зв'язки з Tyr138, Tyr161 і His146 молекули BSA (рис. 3.2,А).

Другий імовірний сайт зв'язування куркуміну характеризувався водневими зв'язками між Ser202, Ile290 і взаємодіями Pi-Pi з Trp214 (рис. 3.2, В).



Б.

Рис. 3.2. Сайти зв'язування BSA і куркуміну. Пунктирні лінії жовтого кольору – водневі зв'язки; сині пунктирні лінії – взаємодії Pi-Pi.

За даними молекулярного докінгу комплекс CRM197 з куркуміном утворювався шляхом формування водневих зв'язків між Lys20, Gly18 і Pi-Pi та ароматичними частинами куркуміну та His17 і Tyr61 CRM197 (рис. 3.3).

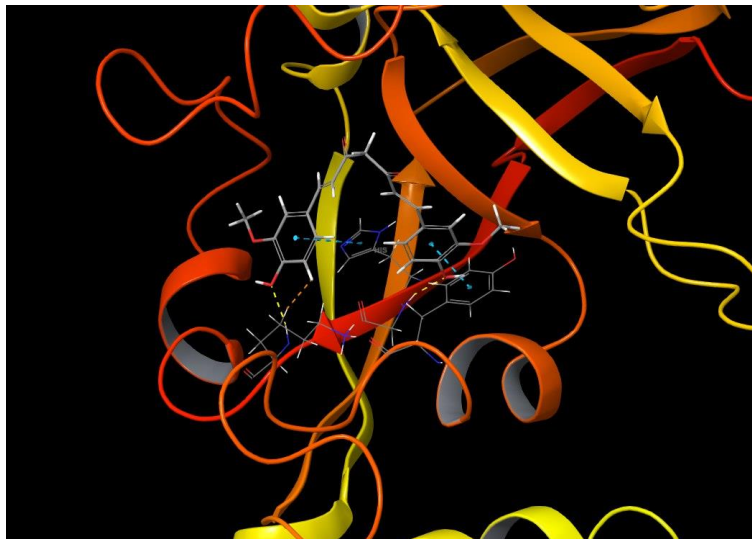


Рис. 3.3. Сайт зв'язування CRM197 і куркуміну. Пунктирні лінії жовтого кольору – водневі зв'язки; сині пунктирні лінії – взаємодії Pi-Pi.

3.1.2. Аналіз чистоти отриманих препаратів нетоксичних рекомбінантних похідних дифтерійного токсину.

Рекомбінантні антигени були експресовані в бактерійній культурі клітин *E.coli* BL21 Rosetta (DE3), яка містить в собі плазмідну ДНК з вбудованим цільовим геном фрагменту ДТ. Після експресії протеїни з культуральної рідини було очищено та проаналізовано методами метал-афінної хроматографії на Ni^{2+} -NTA агарозі та за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу. Оцінивши електрофореграми досліджуваних рекомбінантних протеїнів можна дійти висновку, що протеїни отримані у препаративній кількості та достатньо очищені (рис 3.4.). Отже, дані препарати протеїнів можна використовувати для подальшого дослідження їх комплексів з куркуміном та тестування їх фізико-хімічних та біологічних властивостей.

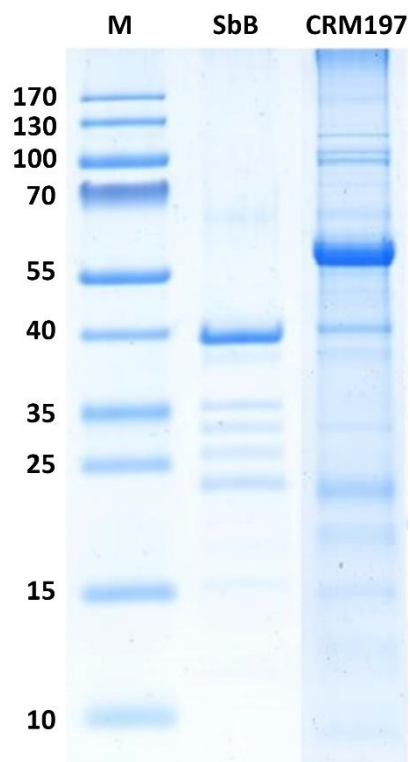


Рис. 3.4. ДСН-ПААГ електрофореграма рекомбінантних протеїнів, очищених за допомогою метала-афінної хроматографії на Ni^{2+} -NTA-агарозі: SbB (37 кДа), CRM197 (58,4 кДа), М - маркер молекулярної маси, кДа.

CRM197 є рекомбінантним нетоксичним похідним ДТ, який відрізняється від ДТ лише однією заміною в амінокислотній послідовності каталітичного домену (Gly52Glu) [69, 221]. CRM197, SbA, SbB і Rd є рекомбінантними аналогами різних частин молекули ДТ, які частково перекриваються і мають таку доменну структуру: CRM197 складається з 3 доменів (С, Т, R); SbA складається з 1 домену (С), SbB складається з 2 доменів (Т, R); Rd складається з 1 домену (R) (рис. 3.1). Окрім того, CRM197, SbA, SbB, Rd містять полігістидинові мітки, які використовуються для їх афінної очистки. На рис. 3.5 представлено амінокислотні послідовності усіх згаданих рекомбінантних похідних ДТ.

Проаналізувавши молекулярні маси отриманих нами протеїнів (Рис.3.4), що описано у розділі 3.2 щодо їх відповідності до амінокислотних послідовностей [69], ми зробили висновок про відповідність їх молекулярних

мас, а значить і про якість та чистоту отриманих протеїнів, які будуть використані у подальшому дослідженні в якості носіїв куркуміну.

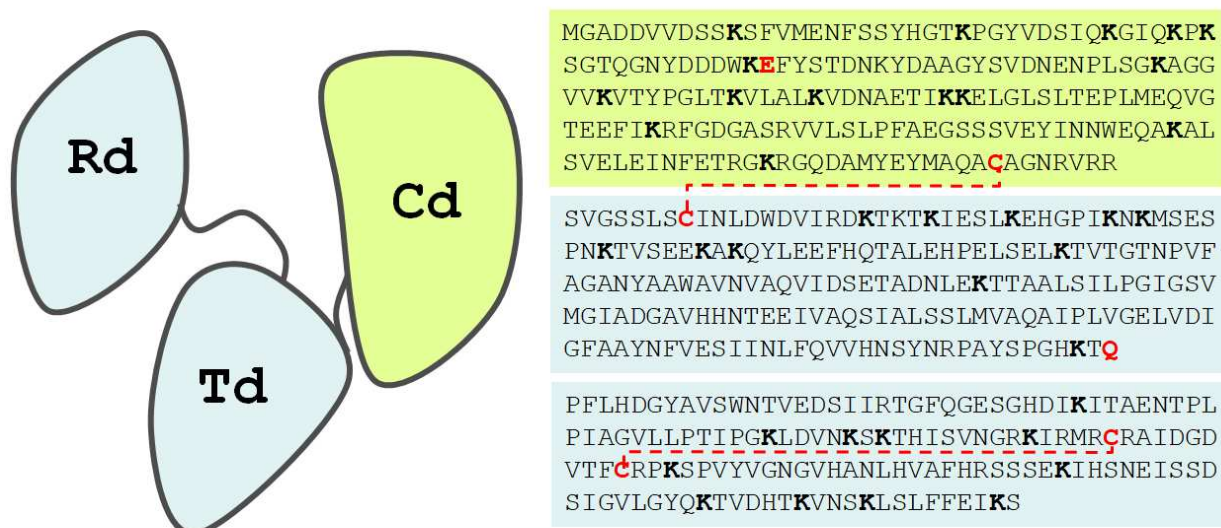


Рис. 3.5. Схематичне зображення молекули дифтерійного токсину, що показує кореляцію між окремими субодинамиціями. N-кінцевий каталітичний домен Cd, який представляє собою субодинамиця A (SbA), показана схемі зеленим кольором. Рецептор-зв'язуючий домен Rd і домен транслокації крізь клітинну мембрану - Td, які разом утворюють субодинамицю B (SbB), зображену на схемі блакитним кольором. Замінені амінокислоти позначені червоним кольором.

3.1.3 Дослідження спектру поглинання отриманих комплексів як характеристика ефективності їх утворення.

CRM197 є протеїном з добре високим рівнем спорідненості до HB-EGFR. Низка ліній пухлинних клітин демонструє надмірну експресію цих рецепторів, що робить CRM197 можливим специфічним агентом доставки куркуміну. Окрім цього ми також використовували BSA як широко використовуваний протеїновий носій для доставки хімічних речовин при медичному застосуванні [206]. Обидва протеїни , BSA та CRM197

розглядалися як перспективні неспецифічні та специфічні носії куркуміну відповідно в нашому дослідженні.

Спектр поглинання куркуміну представляв собою широку смугу з максимальним піком поглинання при довжині хвилі ~ 425 нм. Однак комплекси куркуміну з протеїнами продемонстрували різні спектри з трьома піками у випадку CRM197 (рис. 3.6) і двома піками в присутності BSA (рис. 3.7).

Обидва досліджувані протеїни показали підвищення ефективності поглинання зі збільшенням концентрації куркуміну. Коли співвідношення насичення протеїнів куркуміном було досягнуто, подальшого збільшення швидкості поглинання не спостерігається, що представлено у вигляді плато на графіку. На основі даних розраховане молярне співвідношення становило 1:2,5 і 1:3 для BSA і куркуміну і CRM і куркуміну відповідно.

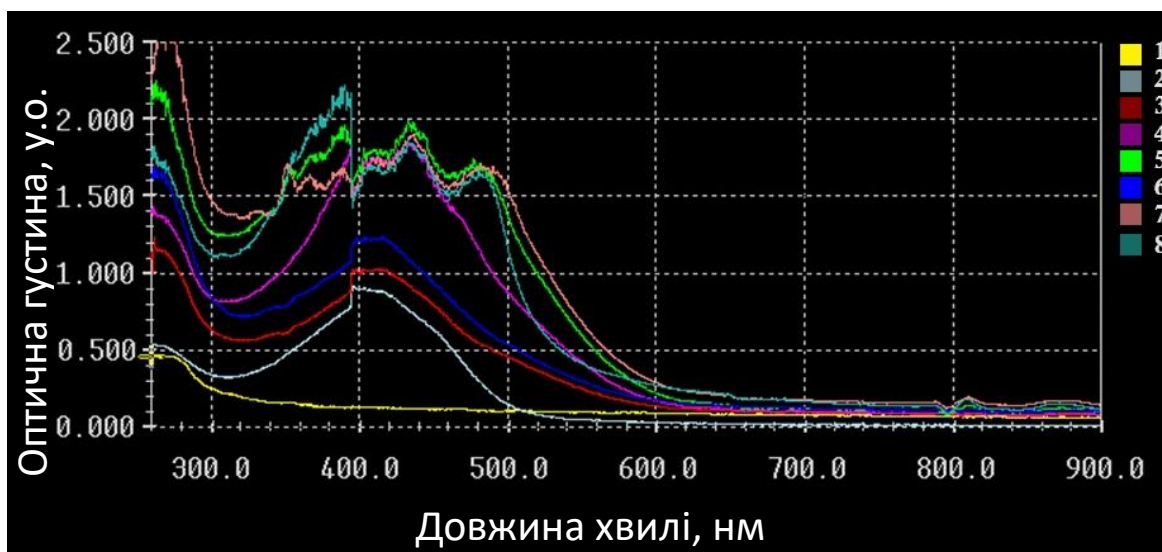


Рис. 3.6. Спектр поглинання куркуміну та його комплексів з CRM197. 1 – CRM197 (0,03 мкМ); 2 – куркумін в PBS 0,3 мкМ; 3 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,009 мкМ куркуміну (1:0,3125); 4 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,01875 мкМ куркуміну (1:0,625); 5 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,0375 мкМ куркуміну (1:1,25); 6 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,075 мкМ куркуміну (1:2,5); 7 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,15 мкМ куркуміну (1:5); 8 – 0,03 мкМ CRM197 і 0,3 мкМ куркуміну (1:10). Усі розчини, що містять куркумін, готували в присутності 0,5 % етанолу.

Це дозволило нам зробити висновок, що спектральна поведінка комплексів може бути доказом стехіометрії комплексів куркуміну з BSA або CRM197. Ми можемо припустити, що більше ніж одна молекула куркуміну може взаємодіяти з однією молекулою обох досліджуваних протеїнів.

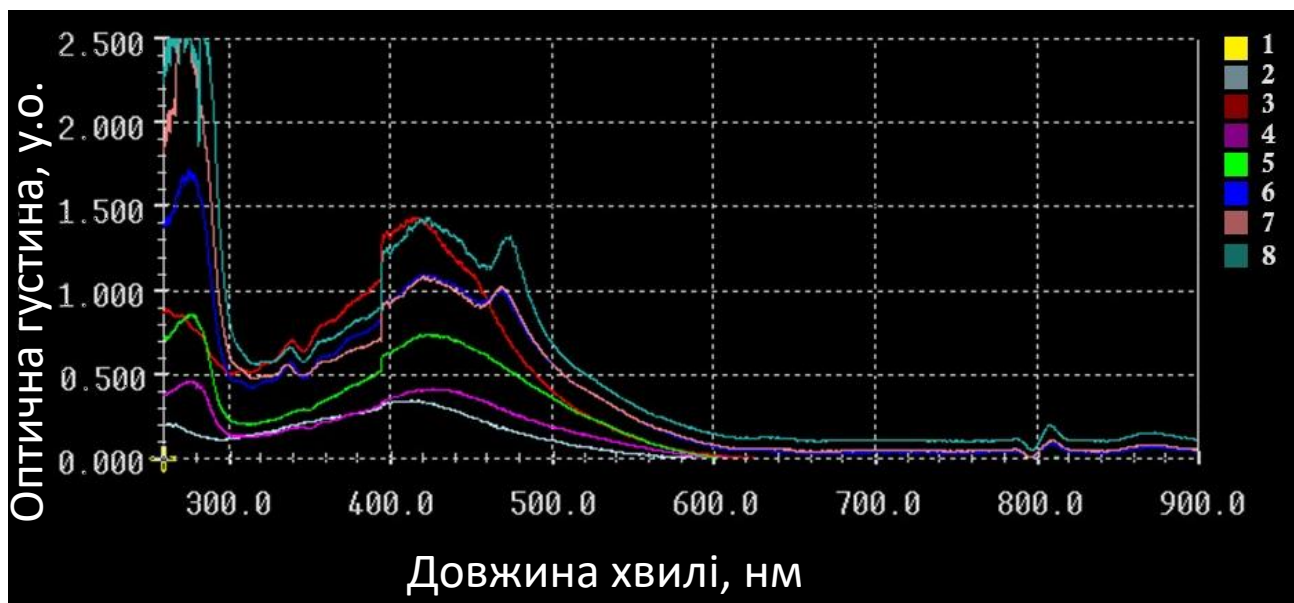


Рис. 3.7. Спектр поглинання куркуміну та його комплексів з BSA.

1 – PBS; 2 – куркуміну в PBS 0,3 мкМ; 3 – BSA (0,03 мкМ); 4 – 0,03 мкМ BSA і 0,01875 мкМ куркуміну (1:0,625); 5 – 0,03 мкМ BSA і 0,0375 мкМ куркуміну (1:1,25); 6 – 0,03 мкМ BSA і 0,075 мкМ куркуміну (1:2,5); 7 – 0,03 мкМ BSA і 0,15 мкМ куркуміну (1:5); 8 – 0,03 мкМ BSA і 0,3 мкМ куркуміну (1:10).

Усі розчини, що містять куркумін, готували в присутності 0,5 % етанолу.

Таким чином, за даними молекулярного докінгу було показано існування двох сайтів сорбції для куркуміну з BSA та одного сайту для сорбції куркуміну CRM197. Спектрофотометричні дані показують існування двох-трьох сайтів сорбції куркуміну для BSA та одного-двох для CRM197. Дане протиріччя може бути пояснене тим, що домени CRM197 є дуже варіабельними, і наявність лише однієї кристалографічної структури не дозволила нам врахувати всі конформаційні зміни, які можуть призвести до утворення сайтів зв'язування куркуміну.

3.1.5 Висновки до розділу

1. Очищені рекомбінантні похідні та їх фрагменти ДТШС₅₅ відповідають амінокислотним послідовностям за своїми молекулярними масами.
2. Молекула нетоксичного рекомбінантного похідного дифтерійного токсину CRM197 має щонайменше один потенційний сайт сорбції з куркуміном.
3. Молекула бичачого сироваткового альбуміну має щонайменше два сайти сорбції з молекулою куркуміну.

3.2. Біологічні властивості куркумін - протейнових комплексів щодо малігнізованих та немалігнізованих клітин

3.2.1. Визначення напівтоксичної дози (IC_{50})

Визначення напівтоксичної дози (IC_{50}) незв'язаного куркуміну

Куркумін є добре вивченим вторинним рослинним метаболітом, отриманим екстракцією коренів *Curcuma longa*, що проявляє протипухлинну активність, але має низький рівень поглинання клітинами [135].

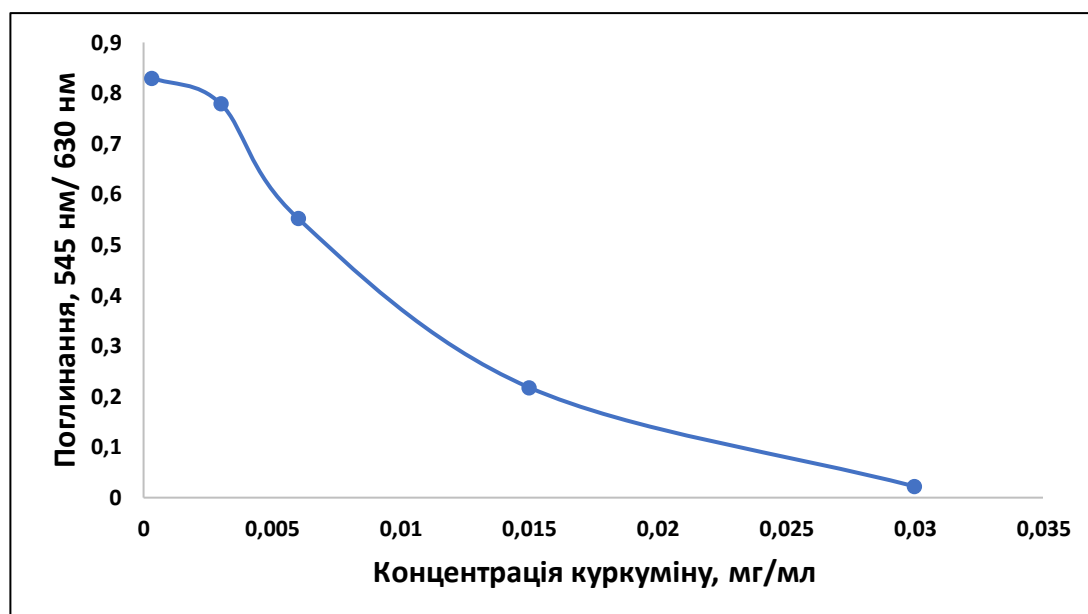


Рис. 3.8. Напівтоксична концентрація (IC_{50}) вільного куркуміну, розчиненого у PBS для клітинної лінії MDA-MB 231. $IC_{50}=0,012$ мг/мл \pm 0,0003. $M \pm m$; $n=3$

Першим етапом дослідження впливу куркуміну на малігнізовані клітини було визначення напівтоксичної дози куркуміну (IC_{50}) на прикладі клітинної лінії MDA-MB-231 (аденокарцинома грудної залози). Титрування куркуміну з використанням цієї лінії клітин показало низьку токсичність вільного куркуміну. IC_{50} вільного куркуміну становила 0,012 мг/мл \pm 0,0003 (рис. 3.8). Таке високе значення IC_{50} вільного куркуміну може бути пояснене рядом факторів, а саме: погана розчинність куркуміну у воді та швидке руйнування його молекули у водному середовищі [108], швидкий метаболізм куркуміну, а також його швидке окиснення [248] і, як наслідок, фактична

неможливість досягнення терапевтичної дози як в організмі, так і в моделі клітинної лінії *in vitro*.

Отримані нами дані демонструють низьку цитотоксичну активність незв'язаного куркуміну щодо лінії малігнізованих клітин. Таким чином, незважаючи на широкий спектр біологічної активності куркуміну [132,155, 175, 269] і, зокрема, виражений антипроліферативний ефект [142, 250] стосовно малігнізованих клітин, потенційне використання куркуміну в медицині як частини протипухлинної терапії вимагає розробки додаткових методів для збільшення поглинання куркуміну клітинами та підвищення його біодоступності.

Визначення напівтоксичної дози (IC_{50}) дифтерійного токсину та його рекомбінантних похідних

Одним із можливих механізмів підвищення біодоступності куркуміну є його сорбція на молекулі-носії, зокрема на носії білкової природи [237]. Дифтерійний токсин є одним із найбільш вивчених природних цитотоксичних агентів зі специфічністю до асоційованого з пухлинними захворюваннями клітинного рецептора proHB -EGF (гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту) [81, 161], який на сьогоднішній день вважається одним з достовірних онкомаркерів [157] і є перспективною мішенню для доставки ліків.

Добре відомо, що HB-EGF бере участь у прискоренні росту та прогресуванні пухлини, метастазуванні та ангіогенезі [144, 171], тому надмірна експресія proHB -EGF була показана на пухлинних клітинах деяких типів пухлинних клітин людини [165, 213], серед яких клітинні лінії A431 [222] і MDA-MB231 [67]. Специфічне інгібування розчинного HB-EGF за допомогою моноклональних антитіл або похідних дифтерійного токсину, зокрема CRM197, широко вивчається як багатообіцяючий спосіб лікування деяких типів пухлинних захворювань людини, але все ще має низьку ефективність через недостатню цитотоксичність щодо малігнізованих клітин [27]. З іншого боку, терапевтичне використання природного бактерійного ДТ обмежене його високою загальною токсичністю щодо організму людини, тому

необхідно використовувати менш токсичні похідні ДТ, такі як імунотоксини та анатоксини, як агенти для специфічної доставки протипухлинних препаратів, включаючи куркумін.

Існує кілька нетоксичних похідних дифтерійного токсину, що представляють практичний інтерес. Одним із них є CRM197, що являє собою дефектний гомолог ADP-рибозилтрансферази, який не має каталітичної активності через заміну глутамінової кислоти в положенні 52 на гліцин та широко використовується в медичній практиці як протеїн-носій для виробництва кон'югованих вакцин [27] та основи для адресної доставки ліків [41]. Нативний ДТ, CRM197 та його рекомбінантний фрагмент SbB, мають однакові трансмембранні домени та діють на клітинну мембрану схожим способом, що призводить до пороутворюючої активності без значної цитотоксичності [203, 204]. Згідно з нашими попередніми дослідженнями молекулярного докінгу, нетоксичний похідний дифтерійного токсину CRM197 або його фрагмент В мають щонайменше один можливий сайт зв'язування з куркуміном. Це робить можливим використання дифтерійного токсиду або його похідних як ефективних молекулярних платформ для доставки куркуміну та подібних фітохімічних речовин всередину клітин-мішеней.

Оцінка токсичності протеїнових переносників є необхідним кроком для будь-якого дослідження щодо можливості включення їх до терапевтичних підходів, включаючи протипухлинну терапію. Отримані нетоксичні похідні дифтерійного токсину є добре вивченими біологічними молекулами з доведеними протипухлинними властивостями [257]. У нашому експерименті як перспективні носії молекул куркуміну використовувалися два варіанти нетоксичних похідних дифтерійного токсину (CRM197 та його фрагмент В). Визначення IC_{50} для двох досліджуваних ліній малігнізованих клітин демонструє безпеку використання обох нетоксичних похідних на відміну від нативного дифтерійного токсину (рис. 3.9, рис. 3.10).

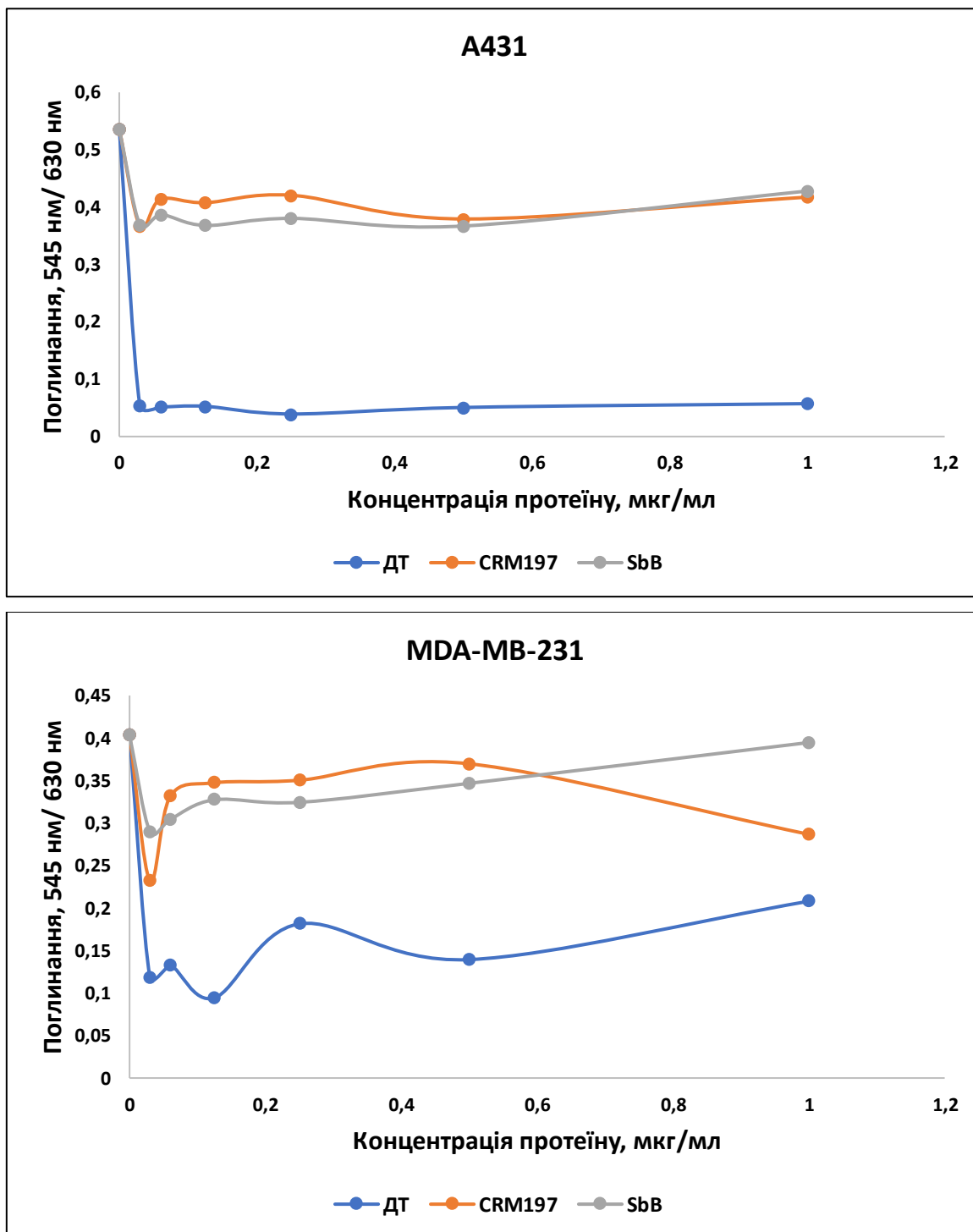


Рис. 3.9. Напівтоксична концентрація IC_{50} нативного ДТ та його нетоксичних рекомбінантних похідних CRM197 та SbB, розчинених в PBS, для клітинних ліній MDA-MB та A431. $M \pm m$; $n=3$

За допомогою отриманих результатів було визначена IC_{50} для дифтерійного токсину $0,48 \text{ мкг/мл} \pm 0,02$ для MDA-MB231 і $0,012 \text{ мкг/мл} \pm 0,003$ для A434, що відповідає даним в літературі [63].

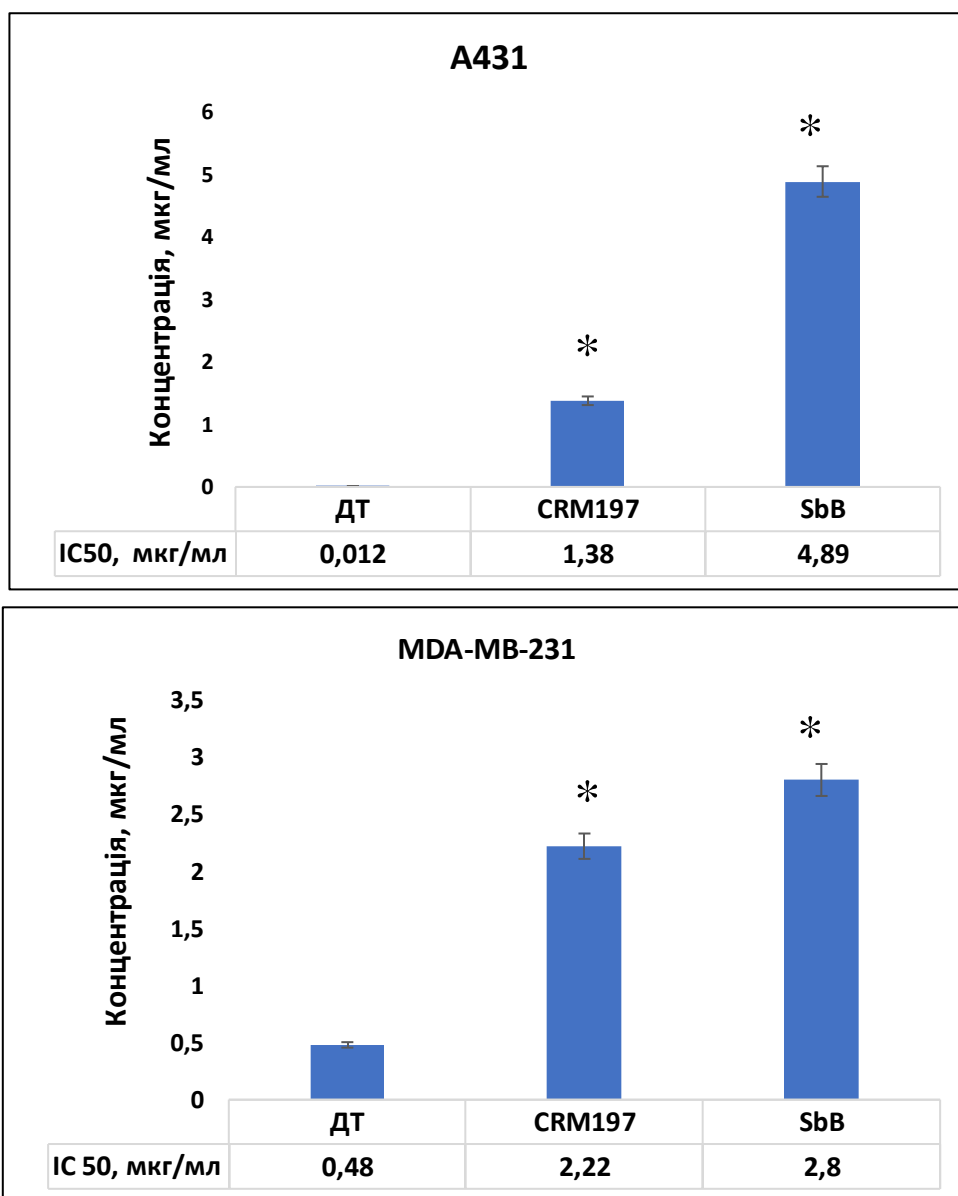


Рис. 3.10. IC_{50} для дифтерійного токсину, CRM197 і SbB для клітинних ліній MDA-MB-231 і A431. $M \pm m$; $n=6$

* - $p < 0,05$ (порівняно з нативним ДТ)

Клітинна лінія A431 демонструє вищу чутливість до дифтерійного токсину через високий рівень експресії proHB-EGF як сайту зв'язування з дифтерійним токсином. IC_{50} для CRM197 і SbB був на два порядки вищим, ніж для дифтерійного токсину для обох перевірених клітинних ліній. Це свідчить про те, що використання CRM197 і SbB є безпечним, тому обидва досліджених рекомбінантних похідні ДТ можуть застосовуватися для доставки ліків у медичній практиці.

3.2.2. Дослідження пороутворювальних властивостей рекомбінантних похідних ДТ як носіїв куркуміну.

У попередньому розділі було показано високий рівень пригнічення життєдіяльності клітин ліній A431 та MDA-MB-231 нативним дифтерійним токсином (IC_{50} складало 0,48 мкг/мл \pm 0,02 для MDA-MB231 і 0,012 мкг/мл \pm 0,003 для A434). CRM197, що має середній рівень цитотоксичної активності щодо низки малігнізованих клітин [41, 109, 137]. В наших дослідженнях були продемонстровані різні результати щодо клітинних ліній A431 та MDA-MB-231. Клітини A431 мали вищу чутливість до CRM197 (IC_{50} = 1,38 мкг/мл \pm 0,02), порівняно з MDA-MB-231 (IC_{50} = 2,22 мкг/мл \pm 0,008). Отримані результати можна пояснити вищим рівнем експресії proHB-EGF рецепторів на поверхні клітин A431 [165, 213]. Незважаючи на суттєво меншу ефективність пригнічення росту та прогресування пухлинних клітин під дією CRM197 порівняно з нативним ДТ, нашим наступним кроком було дослідити механізм впливу CRM197 на пухлинні клітини.

Існує декілька припущень щодо природи токсичного ефекту ДТ. Зокрема, токсичний ефект ДТ може бути пов'язаний з дією каталітичного C-домену, що володіє ADP-рибозилтрансферазною активністю, яка проявляється в цитоплазмі клітини. Перенесення даного домену всередину клітини відбувається за допомогою транслокаційного домену, який створює пору в клітинній мембрані. Дане припущення було висунуто Donovan зі співробітниками, які показали утворення потенціалозалежних іонних каналів, що мали привідність 20 пСм [53]. Нами було висунуте припущення, що цитотоксичний вплив дифтерійного токсину CRM197 може бути обумовлений його пороутворювальними властивостями. Для перевірки даної гіпотези було проведено два дослідження, що залучали визначення провідності фосфатидилетаноламін-вміщуювальної бішарової мембрани (БЛМ) під дією низки блокаторів утворення пор – солей тіазолію з різною

довжиною бічного ланцюга та дослідження впливу кон'югатів блокатора з CRM197 *in vivo* (рис. 3.11).

Провідність каналів, що утворювалися у БЛМ під впливом CRM197 вимірювали під дією +60 мВ, які застосовували до *cis* сторони мембрани. Ефективність провідності було проаналізовано в двох системах розчинів електролітів – симетричній та несиметричній. Всі вимірювання проводилися після додавання до *cis* камери

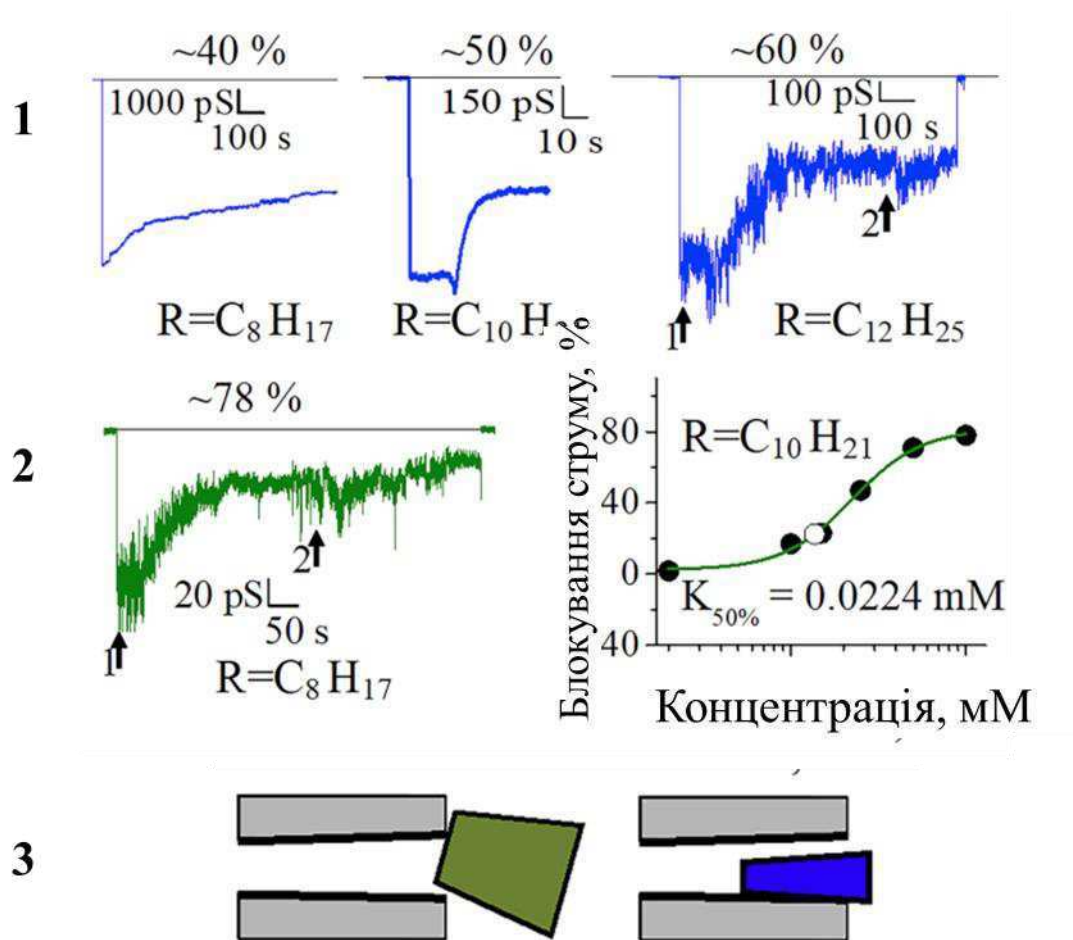


Рис. 3.11. Провідність потенціалзалежних іонних каналів, утворених в присутності CRM197 в присутності солей тіазолію (8 (R = C₈H₁₇) (ОМГТ), 10 (R = C₁₀H₂₁) (ДМГТ) 12 (R = C₁₂H₂₅) (ДДМГТ): 1 – виміри у симетричних 1 М КСl (pH_{cis} 6.0/pH_{trans} 6.0) системах, 2 – виміри у несиметричних системах (pH_{cis} 4.8/pH_{trans} 6.0). 3 - схематичне зображення дії блокатора в порі за вимірюванням у симетричному розчині (зелений колір) та у несиметричному (синій колір). Стрілки 1 і 2 вказують на послідовне додавання похідного

тіазолію до концентрації 0,05 мМ і 0,1 мМ відповідно. Суцільні горизонтальні лінії позначають нульовий рівень струму. Концентрація CRM197 – 3 мкг/мл.

З отриманих даних видно, що більшість графіків відображають зниження провідності в результаті використання різних похідних солей тіазолію в цис-камеру в кінцевій концентрації 0,1 мМ. Зниження макроскопічної провідності потенціалзалежних йонних каналів, утворених під дією CRM197, відбувалося зі збільшенням концентрації всіх досліджених солей тіазолію та досягало насичення за 0,05 мМ або менше (0,02 мМ) [203] у сольових розчинах з різним рН. Рівень зниження електропровідності для всіх перевірених блокаторів був вищим у варіанті несиметричної системи електролітів, що модулює стан ранньої ендосоми.

Отримані дані дозволяють простежити обернену залежність ефективності затримки електропровідності від довжини бічного ланцюга блокатора. ОМГТ, сіль тіазолію, що містить бічний радикал з 8 з атомами карбону у ланцюзі, у наших дослідженнях проявив себе як найперспективніший блокатор серед усіх перевірених нами, що зменшує провідність струму на 60%. ДМГТ, що містить 10 атомів карбону у ланцюзі, індукує 50% зменшення електропровідності. Половина від максимальної швидкості зв'язування з порою CRM197 була досягнута за концентрації ДМГТ 0,02 мМ в 1 М розчині KCl, буферизованому за рН4,8 на *cis*-стороні. Константа дисоціації ДМГТ (K_d), визначена в координатах Хілла, становила $10^{-4,65}$ М з нахилом 0,99. Відсутність позитивної кооперативності при зв'язуванні ДМГТ з порою CRM197, свідчить про його первинне зв'язування лише з одним сайтом CRM197.

Отримані результати щодо зменшення провідності каналу пори CRM197 під дією солей тіазолію дозволяють припустити, що найпотужніші блокатори каналу CRM197 збільшують життєздатність сприйнятливих клітин, оброблених ДТ, шляхом зниження його цитотоксичності [195]. Для перевірки даної гіпотези нами було проведено визначення рівня життєздатності клітин лінії A431 та MDA-MB-231 в присутності CRM197 та різних типів блокаторів.

Три варіанти солей тіазолію з різною довжиною вуглецевого ланцюга (8 (ОМГТ), 9(НМГТ) і 10(ДМГТ) атомів вуглецю в ланцюзі) були обрані відповідно до їх здатності зменшувати електропровідність пори CRM197.

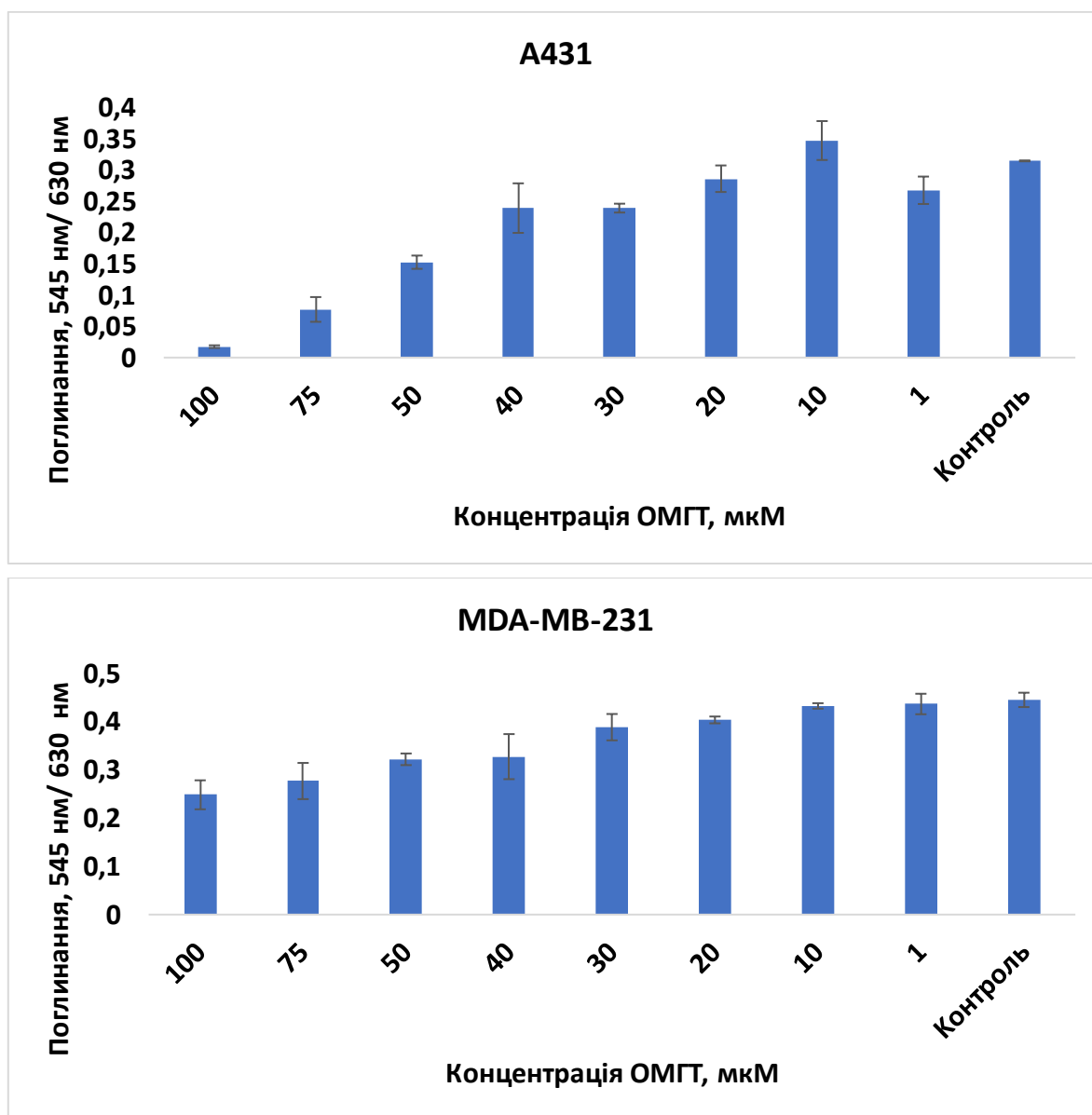


Рис. 3.12. Вживаність клітин з різною концентрацією ОМГТ $M \pm m$; $n=6$.

Першим етапом було дослідження цитотоксичного впливу ОМГТ як найефективнішого блокатора пори CRM197 на БЛМ на малігнізовані клітинні лінії. Рівень цитотоксичності ОМГТ був на рівні контролю(рис. 3.12) для обох перевірених клітинних ліній, що доводить безпечність використання блокатору як потенційного хіміотерапевтичного препарату.

Два інших досліджених блокаторів утворення пори, а саме НМГТ та ДМГТ були перевірені щодо рівня їх цитотоксичності в робочій концентрації 5 мкМ, що використовувалася при дослідженні електропровідності (рис. 3.13).

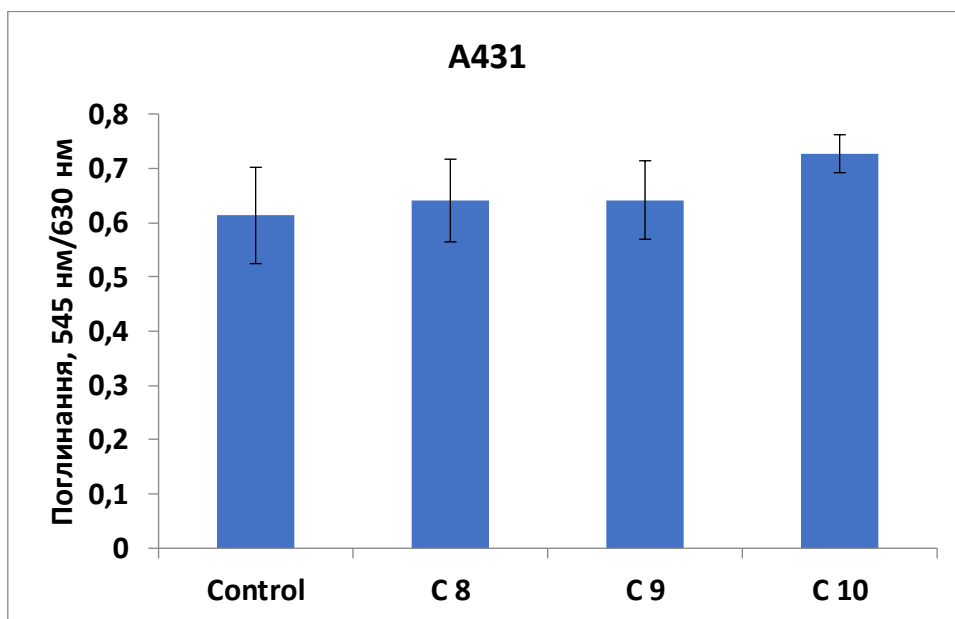


Рис 3.13. Рівень цитотоксичності ОМГТ (C8), НМГТ (C9) та ДМГТ (C10) у робочій концентрації 5 мкМ на клітинну лінію A431. В якості контролю використовувався PBS. $M \pm m$; $n=9$

Наступним кроком після доведення низького рівня цитотоксичності досліджуваних блокаторів на клітини, що межував з впливом PBS, було проведено дослідження впливу кон'югатів CRM197 з блокаторами пор на клітинну лінію A431 (Рис. 3.14).

Серед трьох перевірених блокаторів найкращий результат демонструє НМГТ. Наші дані показують зниження цитотоксичного впливу CRM197 при застосуванні його в комплексі з НМГТ (5 мкМ). Рівень життєздатності клітин збільшився на 30% порівняно з клітинами, обробленими незв'язаним з блокаторами CRM197 у концентрації 10^{-7} мкг/мл.

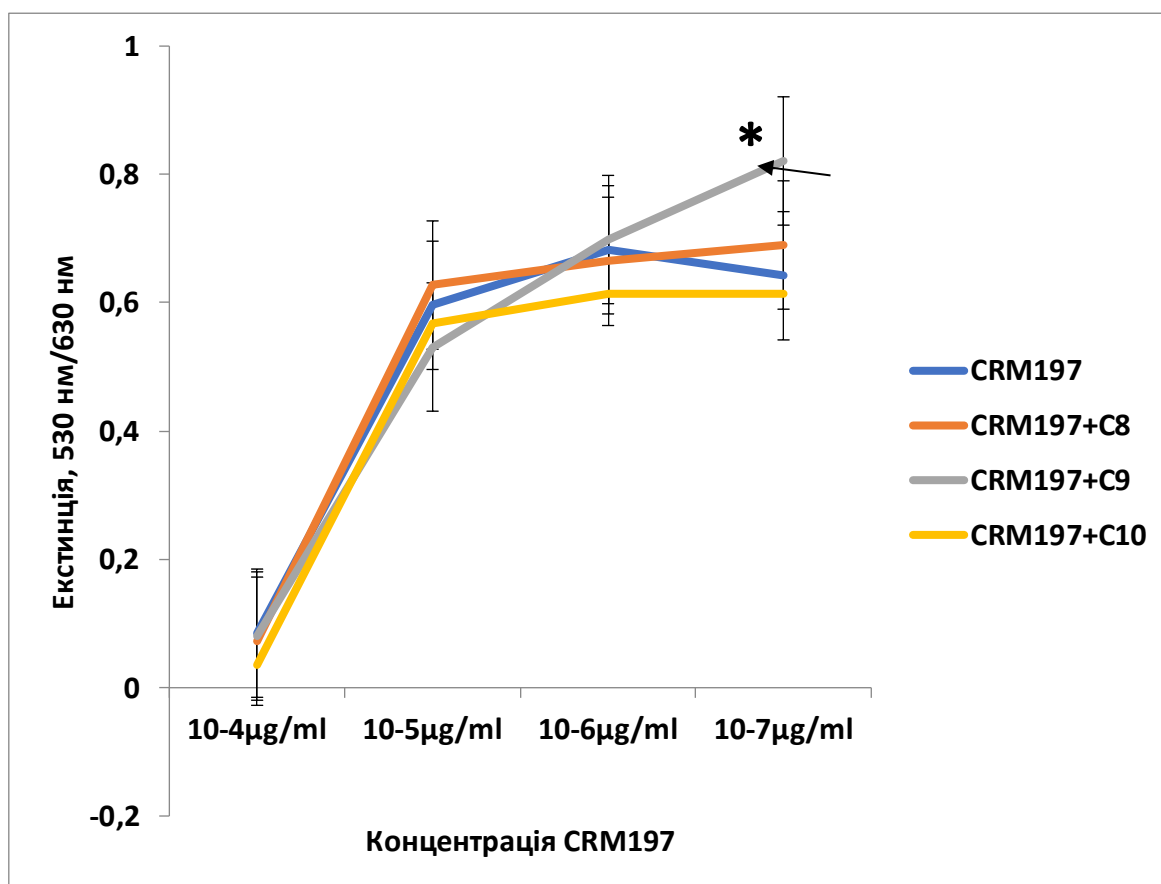


Рис. 3.14. Цитотоксичність кон'югатів солей тіазолію з CRM197 щодо клітинної лінії A431. $M \pm m$; $n=6$

Підвищення рівня життєздатності клітин під дією блокатора каналу пори CRM197 доводить, що цитотоксичний вплив CRM197 частково опосередковується його доведеною пороутворювальною активністю [204].

3.2.3. Визначення напівтоксичної дози (IC_{50}) куркуміну, адсорбованого на нетоксичних похідних дифтерійного токсину

Як було сказано вище, наші попередні дані молекулярного докінгу показали можливий сайт зв'язування з куркуміном для CRM197 і SbV як субодиниці CRM197. Дослідження, описані у попередніх розділах (3.1) доводять безпечність використання запропонованих нами протеїнових носіїв. У зв'язку з цим наступним нашим кроком було визначення ефективності запропонованих куркумін-протеїнових комплексів щодо малігнізованих клітин.

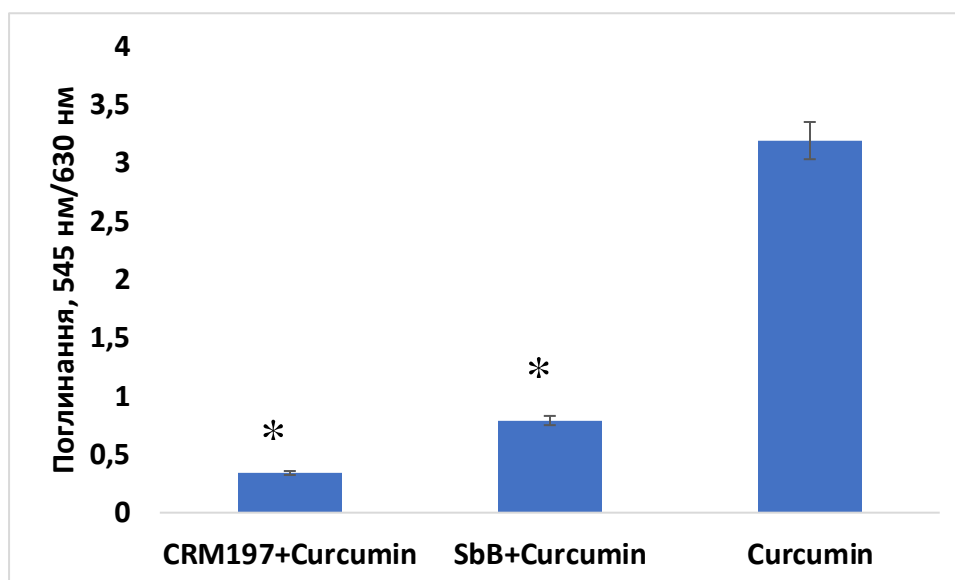


Рис. 3.15. Цитотоксичність протеїн-куркумінових комплексів щодо клітинної лінії MDA-MB-231. $M \pm m$; $n=6$, * - $p < 0,05$ (порівняно з дією вільного куркуміну)

З метою визначення ефективності комплексів ми протестували клітинну лінію MDA-MB 231, щоб оцінити зниження IC_{50} для зв'язаного з похідними ДТ куркуміну (рис. 3.15). IC_{50} комплексів куркуміну становила $\mu\text{кг/мл}$ 0,0008 $\mu\text{кг/мл} \pm 0,006$ для комплексу з CRM197 і $0,0015 \mu\text{кг/мл} \pm 0,005$ для комплексу з SbB для малігнізованих клітин лінії MDA-MB-231. Це свідчить про те, що комплекси куркуміну можуть бути ефективними засобами доставки, здатними суттєво покращити біодоступність куркуміну малігнізованими клітинами [271]. Таким чином комплекси куркуміну з нетоксичними рекомбінантними похідними ДТ можуть бути ефективною частиною протипухлинної терапії у випадку пухлинних клітин зі збільшеним рівнем експресії HB-EGF, що забезпечить адресну доставку куркумінових комплексів до клітин та підвищить імовірність досягнення терапевтичної дози.

3.2.4. Вплив куркуміну та його комплексів на різні типи малігнізованих та немалігнізованих клітин

Дифтерійний токсин і його похідні мають сайти зв'язування з куркуміном, які можуть посилити поглинання куркуміну та, як результат, антипроліферативну активність [109, 272]. Відомо, що куркумін пригнічує

проліферацію широкого спектру пухлинних клітин в основному шляхом апоптозу [225]. Тому наступний крок дослідження був присвячений оцінці ефекту комплексів куркуміну з молекулою доставки SbV як субдиниці нетоксичного похідного ДТ щодо різних типів клітинних ліній, зокрема суспензійних та адгезивних малігнізованих клітин та немалігнізованих іморталізованих ліній. Наші попередні дані молекулярного докінгу показали щонайменше один можливий сайт зв'язування з куркуміном для CRM197 і SbV як частини CRM197. У більшості подальших досліджень нами виокористовувався переважно протеїн SbV як субдинця CRM197, оскільки він проявляв практично ідентичні цитотоксичні властивості щодо малігнізованих клітин з одного боку, та містить в собі рецепторзв'язувальний домен, на якому, ймовірно, розміщений сайт сорбції для куркуміну, з іншого. Окрім того, менші розміри SbV дозволяють отримувати його в більшій концентрації та вищого рівня чистоти. Протеїн SbV, а також комерційний BSA використовували для приготування комплексів з куркуміном у молярному співвідношенні 1:20, щоб забезпечити використання усіх можливих сайтів доставки.

В експерименті ми вибрали 4 клітинні лінії з різним рівнем експресії proHB-EGF: клітини A431 з надмірною експресією, MDA-MB-231 із середнім рівнем експресії [109], клітини 4BL з низьким рівнем експресії та клітинну лінію суспензійних клітин Jurkat – клітини Т-мієдоїдної лейкемії з середнім рівнем експресії proHB-EGF [246]. Лінія клітин 4BL була обрана як модель незлоякісних клітин. Клітини Jurkat були обрані як модель суспензійних клітин, тоді як клітини A431 та MDA-MB-231 були обрані як адгезивні лінії.

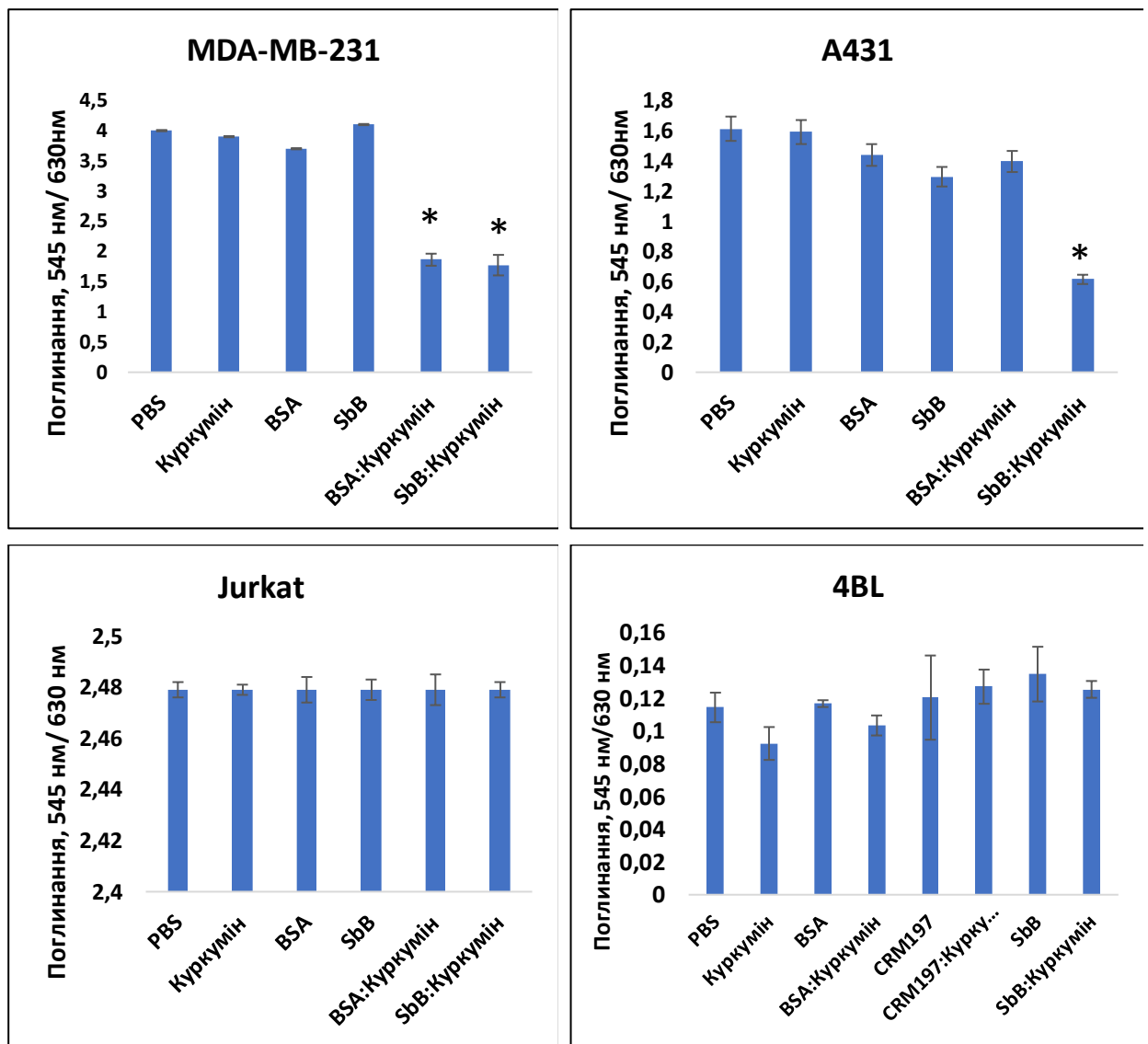


Рис. 3.16. Життєздатність клітин (визначена за допомогою МТТ-тесту) для клітинних ліній A431, MDA-MB 231, Jurkat та 4BL під дією вільного куркуміну та його комплексів з протеїнами BSA і SbB. Використані концентрації: 0,5 мкг/мл для куркуміну, для BSA та SbB - 5 мкг/мл. $M \pm m$; $n=12$, * - $p < 0,05$ (порівняно з дією вільного куркуміну).

Бичачий сироватковий альбумін використовували як протеїновий носій без специфічної спорідненості до рецепторів HB-EGF Клітини A431, MDA-MB-231, Jurkat та 4BL обробляли незв'язаним куркуміном та його комплексами з SbB або BSA. Життєздатність цих клітин оцінювали за допомогою методу МТТ через 24 години після обробки куркумін-протеїновими препаратами в концентраціях, показаних на рис.3.16.

Було продемонстровано, що життєздатність клітин MDA-MB-231 оброблених комплексами куркумін:BSA та куркумін:SbB, зменшується в 1,5 рази порівняно з впливом незв'язаного куркуміну. Для клітинної лінії A431 інгібування чистим SbB було незначним (23%), так само як і для клітин MDA-MB-231 (рівень життєздатності при обробці SbB залишався на рівні контролю), комплекс SbB з куркуміном знижував життєздатність MDA-MB-231 і A431 клітин на 49% і 71% відповідно.

На відміну від малігнізованих адгезивних клітин A431 та MDA-MB-231, які мають високий та середній рівень експресії proHB-EGF, суспензійні малігнізовані клітини лінії Jurkat проявили себе нечутливими як до впливу куркуміну, так і його протеїнових комплексів. Це дозволило нам припустити, що комплекси куркуміну з нетоксичними похідними ДТ є ефективними лише стосовно адгезивних малігнізованих клітин з високим та середнім рівнем експресії proHB-EGF.

Відсутність зниження життєздатності для всіх досліджуваних варіантів обробки (як вільним куркуміном, так і його протеїновими комплексами) відносно контролю дозволило нам використовувати клітини 4BL як модель нормальних незлоякісних клітин для оцінки нетоксичності комплексів куркуміну як потенційного препарату для немалігнізованих клітин, що доводить безпечність використання комплексів у протипухлинній терапії.

3.2.5. Імуногенність окремих функціональних доменів та субодиниць нетоксичного рекомбінантного дифтерійного токсину

Дослідження ефективності імунізації

Заключним етапом нашої роботи було оцінити імуногенність отриманих рекомбінантних протеїнів для оцінки можливості їх використання в створенні комерційних медичних препаратів, включаючи комплекси з куркуміном. На початку дослідження нами було оцінено рівень ефективності імунізації, що проявили імунізовані лабораторні миші. У схемі нашого дослідження окремі

групи мишей були вакциновані дифтерійним анатоксином та дифтерійним токсодом CRM197, а також його окремими субодинаціями та їх сумішами. Всього ми використали 7 груп тварин по 10 мишей в кожній групі:

1 група – CRM197

2 група – АДТ

3 група - SbA+SbB

4 група – SbB

5 група – SbA

6 група – R-домен

7 група (контроль) – $Al(OH)_3$

Ефективність імунної відповіді було оцінено за зміною титру антитіл у сироватках крові досліджуваних тварин. Було проведено моніторинг змін титру антитіл, що свідчить про наявність імунної відповіді, яка формується у відповідь на певну антигенну субстанцію. Для досягнення цієї мети, було порівняно значення ОГ (оптична густина) після проведення ІФА для зразків сироватки крові мишей до імунізації, після першої, другої та третьої ревакцинації. До уваги було взято групу 1, тварини якої були імунізовані CRM197 та контрольну групу 7, для імунізації якої використовували алюміній гідроксид $Al(OH)_3$. Ці дві групи були обрані для наочної демонстрації пропорційного зростання рівнів антитіл при кожному наступному введенні АГ (Рис. 4.10).

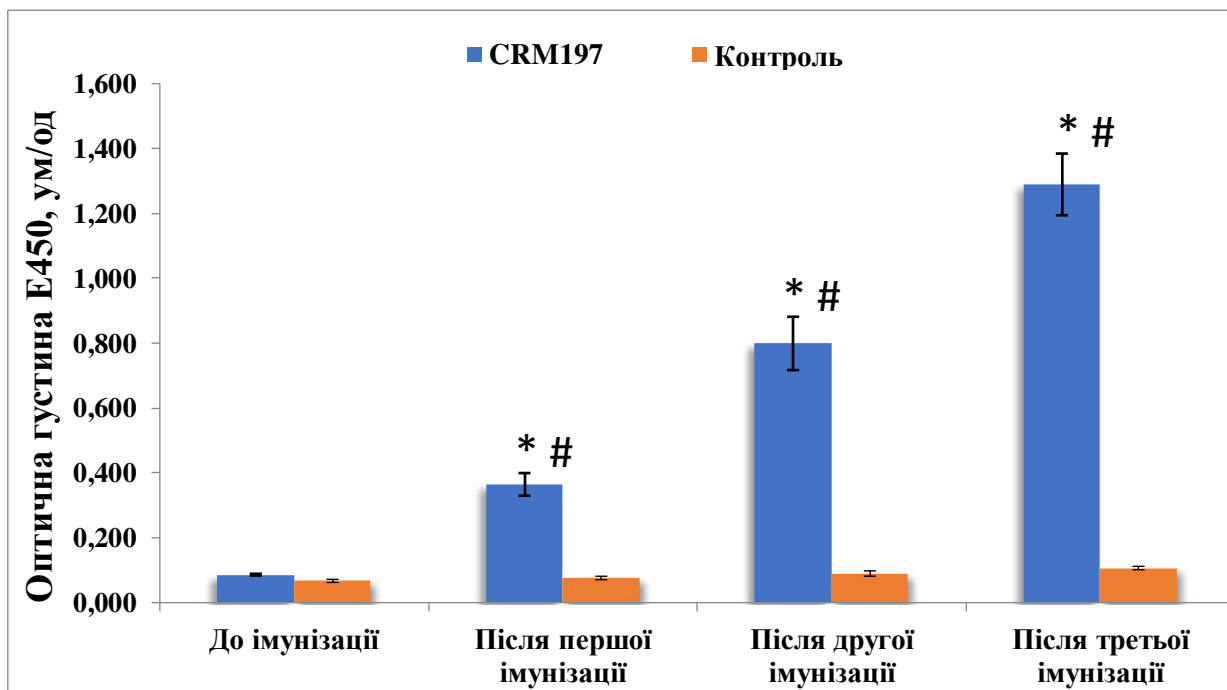


Рис. 3.17. Ефективність імунізації антигенною субстанцією із CRM197 у порівнянні з контролем ($M \pm \sigma$, $n = 7$). * - $p < 0,05$ (порівняно з контролем в межах окремої стадії імунізації), # - $p < 0,05$ (порівняно зі значеннями до імунізації)

Оцінивши отриманий графік можна зауважити, що титр антитіл у групі 1 пропорційно зростає, що свідчить про наявність адекватної гуморальної імунної відповіді на антиген, а отже імунізація була проведена вдало. У свою чергу в контрольній групі значення ОГ майже не змінюється, що вказує на практично відсутню АТ-продукцію, у відповідь на $Al(OH)_3$.

Вибір субстанції з найвищою імуногенністю

Результати експериментального дослідження демонструють, що рівень антитіло-утворення у відповідь на різні антигени значно варіює. Для кожного антигену рівні антитіл у сироватці крові оцінювали на основі показника індексу оптичної щільності (ODI - optical density index), співвідношення між ОГ, отриманих при тестуванні зразків сироватки, зібраних після імунізації, та ОГ, отриманих для зразків, зібраних у тієї ж тварини на початковому етапі (до імунізації).

Найнижчі рівні антитіл були виявлені у 5 та 6 дослідній групі, які були імунізовані SbA ($ODI \geq 1,1$) та Rd ($ODI \geq 2,5$), відповідно, що свідчить про дуже слабку імунну відповідь на ці антигени. У ході зростання показнику ODI далі слідує 4 група, для якої в якості антигену використовували SbB ($ODI \geq 7,4$), отримане значення демонструє, що SbB здатна спричинити набагато вищий рівень утворення антитіл, ніж SbA. SbB є ключовою субодиницею у формуванні гуморальної імунної відповіді у випадку імунізації лабораторних тварин еквімолярною сумішшю SbA та SbB ($ODI \geq 11$), що разом складає рекомбінантний варіант цілої молекули дифтерійного токсину. Це також може бути пов'язано з істотною різницею молекулярних мас даних протеїнів (SbB (37 кДа), SbA (21 кДа), або з наявністю серологічно важливих епітопів саме на ділянці SbB. Порівнявши результати, отриманні при тестуванні сироваткового матеріалу з груп 1-3, одержали такі значення CRM197 ($ODI \geq 14,9$), АДТ ($ODI \geq 10,5$), суміш SbA та SbB ($ODI \geq 11$) (рис. 3.18.).

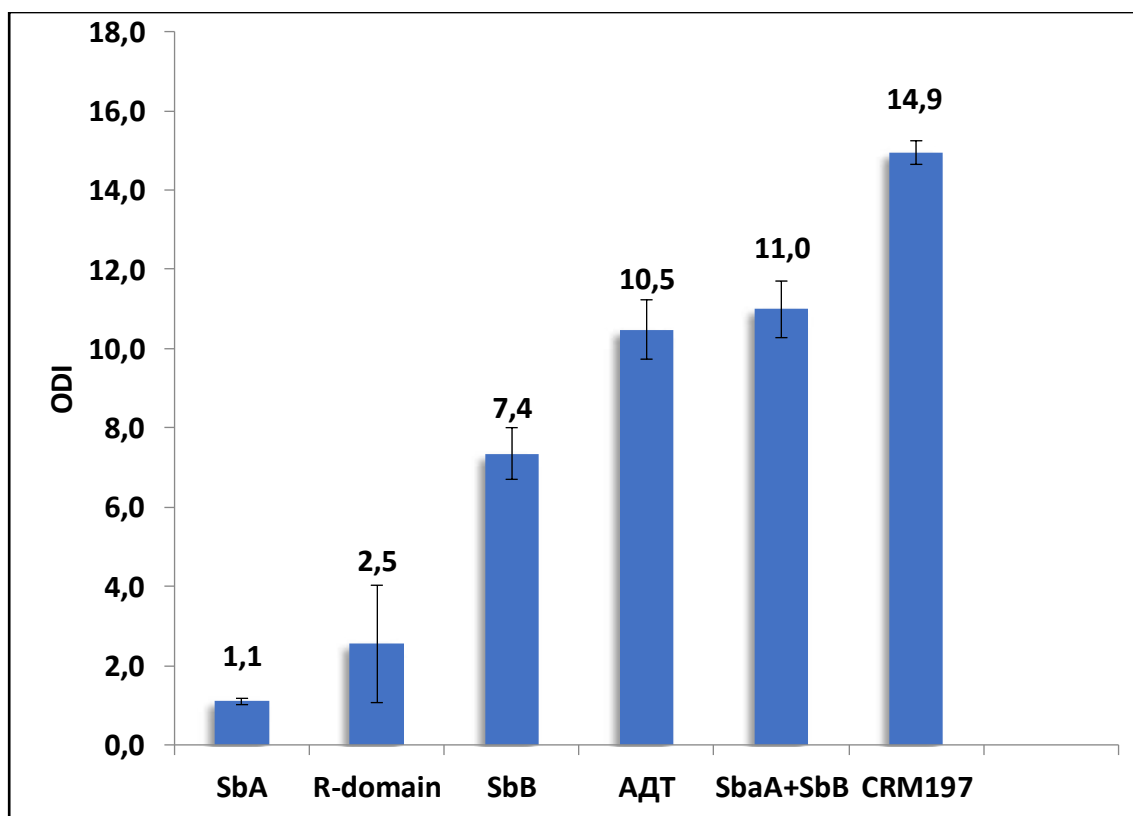


Рис. 3.18. Значення ODI (індекс оптичної щільності) для рекомбінантних протеїнів, використаних в експерименті ($M \pm \sigma$, $n = 7$).

Саме у цих групах спостерігалися найвищі значення даного показника. Ці результати можна обґрунтувати тим, що дані антигенні конструкції мають більшу подібність амінокислотного складу до нативного дифтерійного токсину.

Проаналізувавши отримані показники ODI, дійшли висновку, що найкращими імуногенними властивостями характеризується отриманий в нашій лабораторії рекомбінантний нетоксичний токсод CRM197, тобто у відповідь на даний антиген формується найбільша гуморальна імуна відповідь, тоді як SbB проявив нижчий рівень імуногенності, що у свою чергу є підґрунтям для використання саме В-субодиниці як носія куркуміну, оскільки цей кон'югат не буде викликати активної імунної відповіді та проявляє себе як більш безпечний при використанні *in vivo*.

3.2.6. Висновки до розділу

1. Незв'язаний куркумін проявляє незначну цитотоксичну дію щодо малігнізованих клітин. IC_{50} куркуміну для клітинної лінії MDA-MB-231 становить 32,8мкМ
2. Нетоксичні похідні дифтерійного токсину (CRM197, SbB) не проявляють токсичного ефекту щодо клітин людського організму, а отже можуть бути використані як носій медичних препаратів, зокрема куркуміну.
3. Утворення комплексів куркуміну з нетоксичними похідними дифтерійного токсину значно підвищило біодоступність куркуміно щодо малігнізованих клітин. IC_{50} для комплексів куркуміну з CRM197 та SbB становили 4,2мкМ та 2,2мкМ відповідно.
4. Пригнічення адгезивних малігнізованих клітинних ліній A431 та MDA-MB-231 комплексами SbB з куркуміном було на рівні 71% та 49% відповідно.
5. Куркумін та його комплекси з CRM197 та SbB проявляли пригнічуючий вплив на адгезивні малігнізовані клітини, тоді як не впливали на суспензивні малігнізовані клітини та немалігнізовані клітини

6. В-фрагмент є перспективним протеїновим носієм куркуміну на рівні цілого організму через свою низьку імуногенність порівняно з CRM197.

3.3 Механізми впливу куркуміну на малігнізовані клітини

3.3.1. Визначення впливу протеїнових носіїв на ефективність взаємодії куркуміну з поверхнею клітин ссавців

Оцінка ефективності взаємодії куркуміну з поверхнею клітин може бути використана як додатковий доказ нашої гіпотези щодо наявності сайтів зв'язування куркуміну на нетоксичних похідних ДТ (у дослідженні протестовано лише фрагмент В). Ефективність взаємодії з поверхнею клітин вільного куркуміну та його протеїнових комплексів була досліджена за допомогою протокової цитофлуориметрії та вимірювань індукованої куркуміном флуоресценції в клітинах-мішенях після 24 годин інкубації. Інтенсивність флуоресценції оцінювали за двома модельними лініями пухлинних клітин A431 і MDA-MB-231 (рис. 3.19).

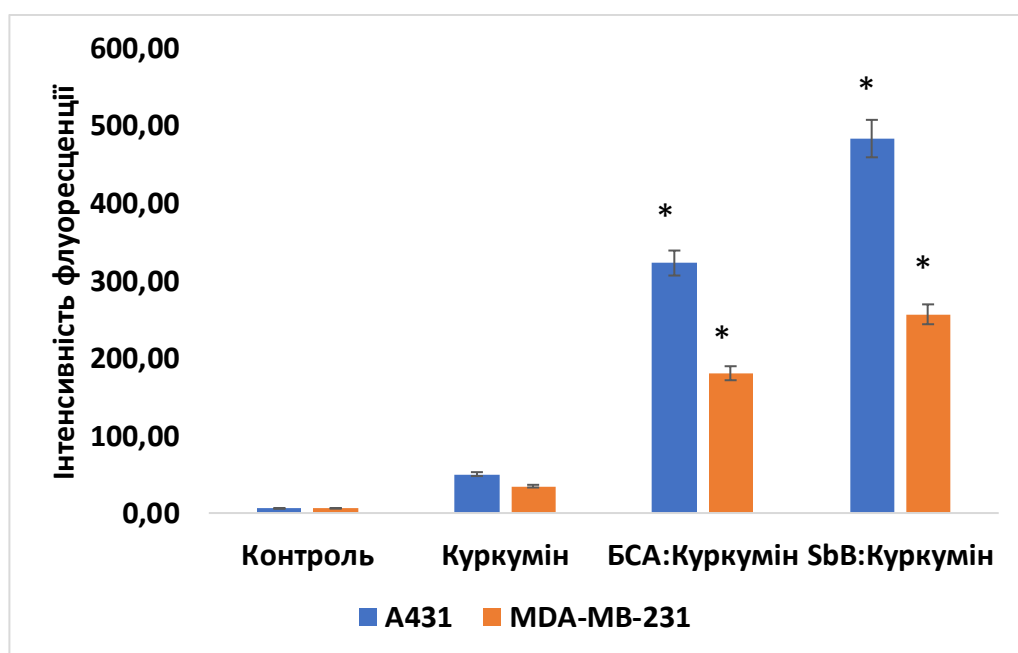


Рис. 3.19. Ефективність взаємодії куркуміну та його комплексів з SbB для клітинних ліній A431 і MDA-MB-231. Контроль - PBS, куркумін 0,5 мкг/мл, BSA 5 мкг/мл: куркумін 0,5 мкг/мл, SbB 5 мкг/мл: куркумін 0,5 мкг/мл, CRM197 5 мкг/мл: куркумін 0,5 мкг/мл. ($M \pm \sigma$, $n = 3$). * - $p < 0,05$ (порівняно з вільним куркуміном)

Наші результати продемонстрували суттєве зростання ефективності взаємодії комплексів куркуміну клітинами A431 порівняно з вільним куркуміном. Показано, що він збільшується принаймні в 6 і 10 разів для комплексів BSA:Cur та SbB:Cur відповідно. Для клітиної лінії MDA-MB-231 ефективність взаємодії куркуміну у комплексах з BSA та SbB збільшилася більше ніж у 5 та 7 разів відповідно (рисунк 3.19).

3.3.2 Вплив рекомбінантних похідних дифтерійного токсину на внутрішньоклітинну акумуляцію куркуміну клітинами ссавців

Час інтерналізації незв'язаного куркуміну та його протеїнових комплексів є важливою характеристикою, яка може пояснити збільшення поглинання клітинами білкових комплексів куркуміну порівняно з незв'язаним куркуміном.

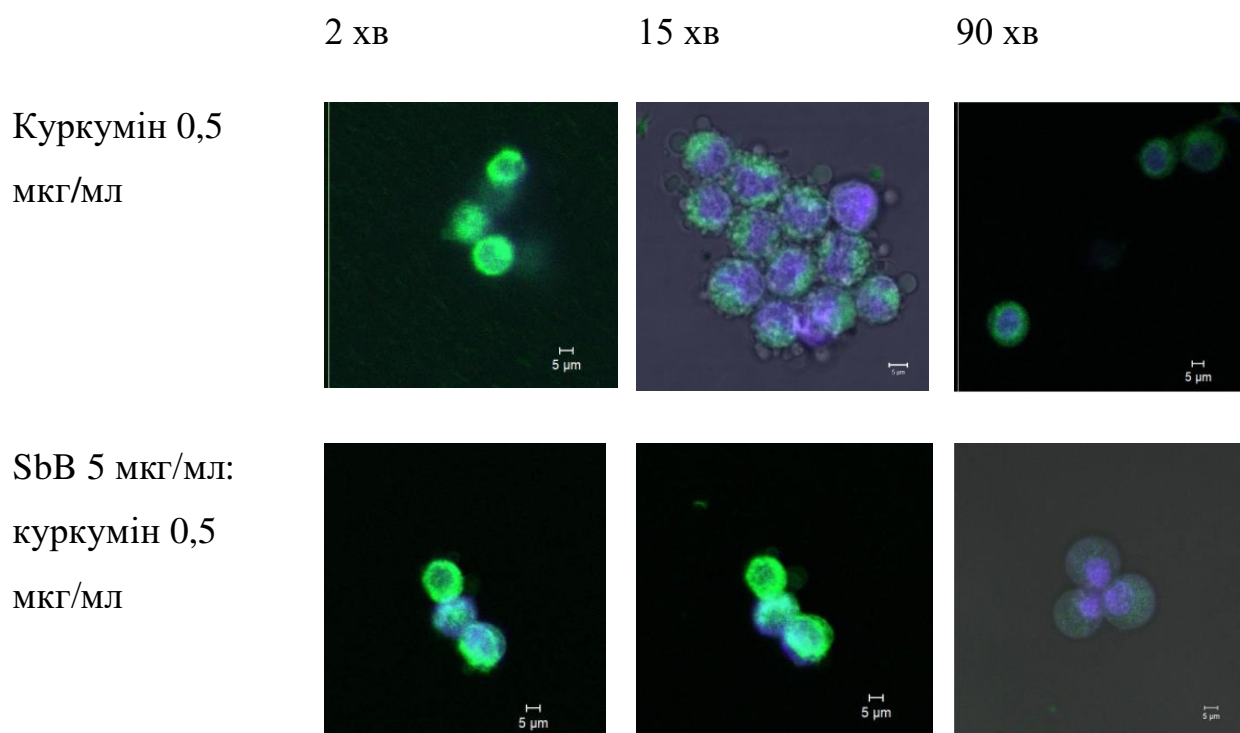


Рис. 3.20. Інтерналізація куркуміну та його комплексів пухлинними клітинами лінії A431 залежно від часу експозиції (0,5 мкг/мл куркумін, 5 мкг/мл SbB. Час інкубації: 2 хв, 15 хв, 2 год. Масштаб - 5 мкм.

Клітинна лінія A431 була використана нами для дослідження здатності до інтерналізації через високий рівень proHB-EGF, який може взаємодіяти з дифтерійним токсином та його похідними. Нами показано, що незв'язаний куркумін перетинає клітинну мембрану вже протягом перших 15 хвилин, тоді як комплекси куркуміну з білковими носіями стають повністю інтерналізованими лише впродовж 90 хвилин (рис. 3.20).

Сповільнене транспортування білково-куркумінового комплексу до клітини можна пояснити взаємодією SbB і CRM197 з proHB-EGFR. На рисунку 5.2 показано позаклітинний розподіл куркуміну на початковій стадії інтерналізації. Після 1,5 годин експозиції всі досліджувані варіанти (куркумін і його 1:20 комплекси з BSA та SbB) були повністю поглинуті клітинами. Це підтверджено внутрішньоклітинним розташуванням куркуміну, який дає флуоресценцію у зеленому спектрі. Подібна картина спостерігається для всіх типів протестованих комплексів куркуміну.

3.3.3 Дослідження здатності куркуміну та його комплексів з протеїнами індукувати апоптоз

Протягом останніх десятиліть однією з найбільш застосовних мішеней у лікуванні раку були клітинні сигнальні шляхи, які викликали апоптоз [32, 37]. Супресивна активність куркуміну незважаючи на його низьку біодоступність доведена багатьма авторами [13, 109, 251, 255, 266, 270]. Існує багато уявлень про механізми інгібування ракових клітин куркуміном або його комплексами чи похідними. У багатьох дослідженнях [13, 14, 240, 206] апоптоз розглядається як провідний спосіб інгібування клітин. Тому наступним кроком нашого дослідження було дослідити рівень куркумін-індукованого апоптозу та його залежність від наявності протеїнових носіїв для куркуміну. В якості носіїв специфічної доставки ми використовували SbB фрагмент рекомбінантного похідного ДТ, тоді як в якості неспецифічного протеїнового носія нами було використано молекулу BSA. Протокова цитофлуориметрія була обрана як надійний і точний метод для оцінки рівня

апоптозу. Отримані результати показали зниження життєздатності клітин MDA-MB 231 і A431 під дією протеїн-куркумінових комплексів (рис. 3.21) .

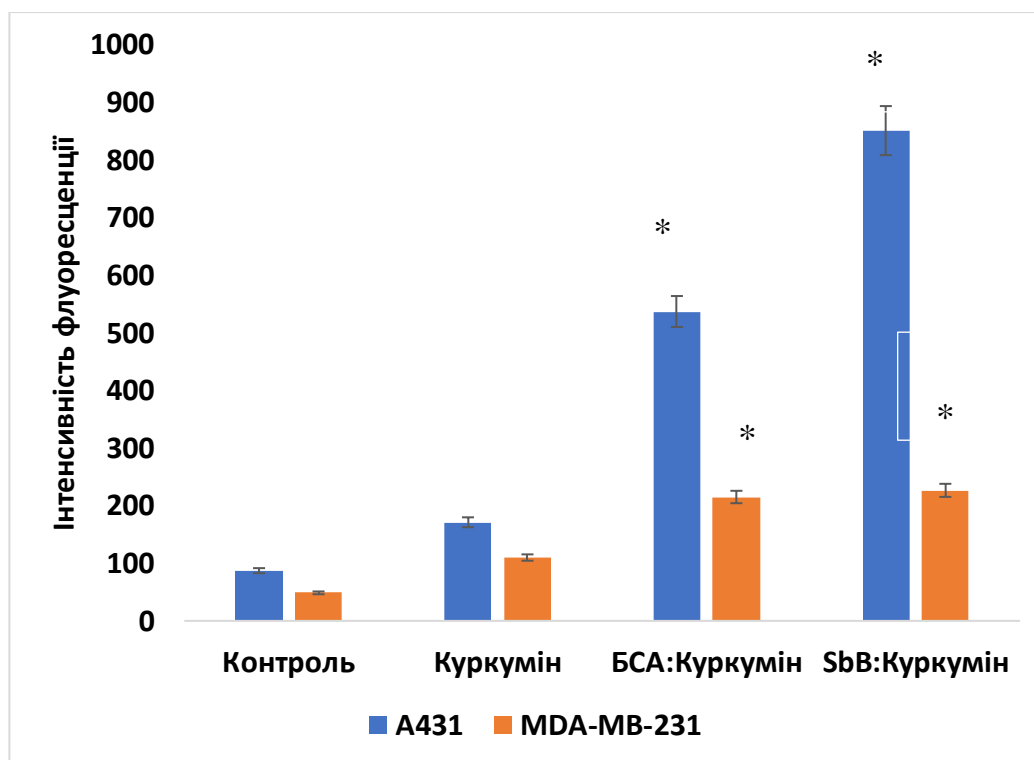


Рис. 3.21. Комплекси куркуміну з протеїнами ефективно індукують апоптоз в пухлинних клітинах ліній A431 та MDA-MB 231. Дослідження проводили за допомогою протокової цитофлуориметрії . Контроль - PBS, 0,5 мг/мл куркумін, 05 мкг/мл BSA, 5 мкг/мл SbV. * - $p < 0,05$ (порівняно з вільним куркуміном)

Клітини лінії 4BL здебільшого не проявили рівня апоптозу, який суттєво б відрізнявся від контролю. Це можна пояснити як низькою біодоступністю самого куркуміну, так і низьким рівнем експресії рецептора pro-HB-EGF, що робить для цих клітин недоцільним підвищення біодоступності шляхом сорбції на похідних ДТ. Таким чином можна зробити висновок, що немалігнізовані клітини з незміненою експресією proHB-EGF є нечутливими до запропонованих комплексів і тому є безпечними для використання в медичній практиці протипухлинної терапії.

Щодо малігнізованих адгезивних клітин наші дані (рис. 3.21) вказують на набагато вищий рівень апоптозу для клітин, оброблених протеїновими комплексами куркуміну відносно до дії незв'язаного куркуміну. Використання

комплексів BSA:Куркумін або SbB:Куркумін підвищило рівень загибелі клітин A431 у 3,14 та 4,97 разів відповідно, тоді як життєздатність клітин MDA-MB-231 знизилася в 2 рази порівняно з контролем для обох використаних білкових носіїв. Аналізуючи подібні ефекти специфічного носія (SbB) та неспецифічного носія (BSA) ми можемо припустити, що механізм та ефективність апоптозу в першу чергу зумовлені безпосередньо молекулою куркуміну, тоді як BSA та SbB виконують суто роль переносників.

3.3.4 Порівняльний аналіз здатності куркуміну та його комплексів з протеїнами індукувати некроз

Виражена цитотоксична дія куркуміну та його комплексів була показана нами у розділі 3.2. Наступним етапом було дослідження шляху загибелі клітин. Двома протилежними шляхами загибелі клітин є апоптоз, запрограмована загибель клітин, та некроз. Визначення шляху загибелі клітин засноване на дослідженні структурних змін клітин і дозволяє вже на початкових етапах виявити шлях розвитку клітини. Зокрема, одним із ранніх маркерів апоптичної загибелі клітини є фосфоліпідні перебудови у внутрішньому та зовнішньому шарах мембрани, що проявляється у перенесенні фосфатидил серину з внутрішнього шару мембрани на зовнішній, що можливо детектувати за допомогою специфічного кальцій-залежного фосфатидил серин-зв'язувального протеїну Анексин V. Некроз, в свою чергу, пов'язаний з втратою цілісності мембрани, через яку можуть проникати ДНК-зв'язувальні пігменти, зокрема, пропідій йодид. Таким чином, комбіноване використання пропідій йодиду та Анексину V дозволяє визначати шлях загибелі клітини, навіть якщо вони знаходиться ще на ранніх етапах розвитку цього шляху.

Нами не виявлено значного впливу протеїнових носіїв BSA та SbB на рівень апоптозу та некрозу порівняно з контрольними клітинами (Рис. 3.22). Водночас, куркумін та його комплекси переважно викликають загибель клітин шляхом апоптозу, тоді як некротичні клітини склали меншу частку.

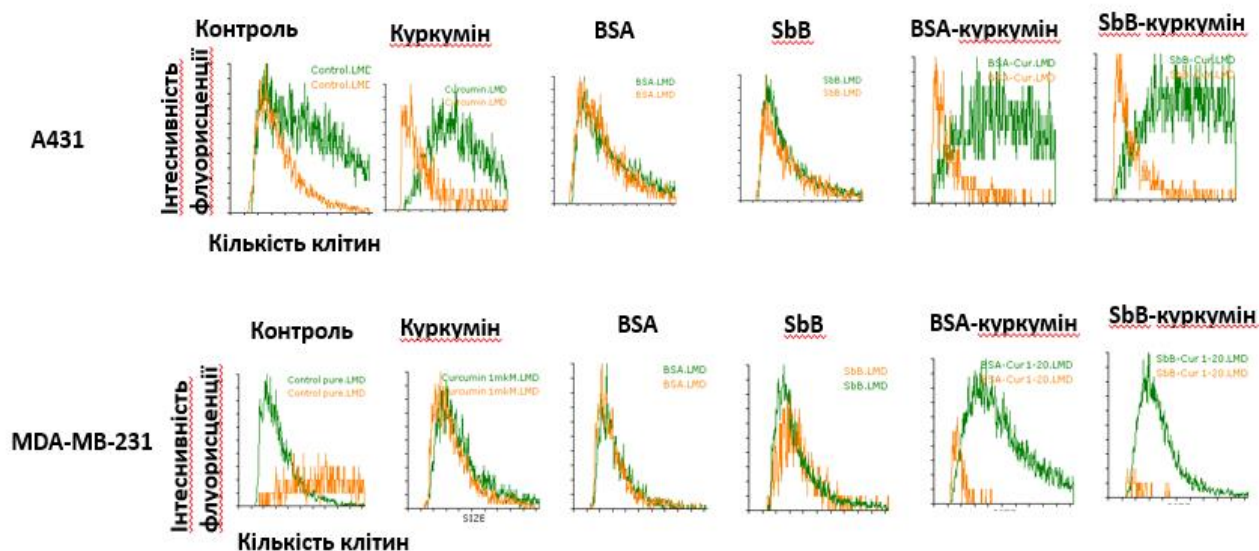


Рис. 3.22. Куркумін та його комплекси з протеїнами BSA та SbB викликають загибель малігнізованих клітинних діній A431 та MDA-MB-231 переважно шляхом апоптозу. Дослідження проводили за допомогою протокової цитофлуориметрії. Контроль - PBS, 0,5 мг/мл куркумін, 05 мкг/мл BSA, 5 мкг/мл SbB. Аннексин V – зелений колір, пропідій йодид – оранжевий колір.

Тенденція щодо переважання апоптичного шляху клітинної загибелі над некротичним шляхом спостерігалася для обох перевірених нами клітинних ліній адгезивних малігнізованих клітин, а саме A431 та MDA-MB-231. Високий рівень апоптозу, що суттєво переважає рівень некрозу, є бажаним результатом застосування протипухлинних ліків, оскільки некроз може спровокувати численні пошкодження організму [48, 171].

3.3.5. Вплив куркуміну та його компоєксів з протеїнами на основні шляхи сигнальної трансдукції

У попередніх розділах (3.3.3, 3.3.4) нами було доведено, що апоптоз, спричинений дією куркуміну та його протеїнових комплексів, є провідним шляхом загибелі малігнізованих клітин. Заключним етапом нашої роботи було дослідження основних сигнальних шляхів, задіяних в ініціації апоптозу.

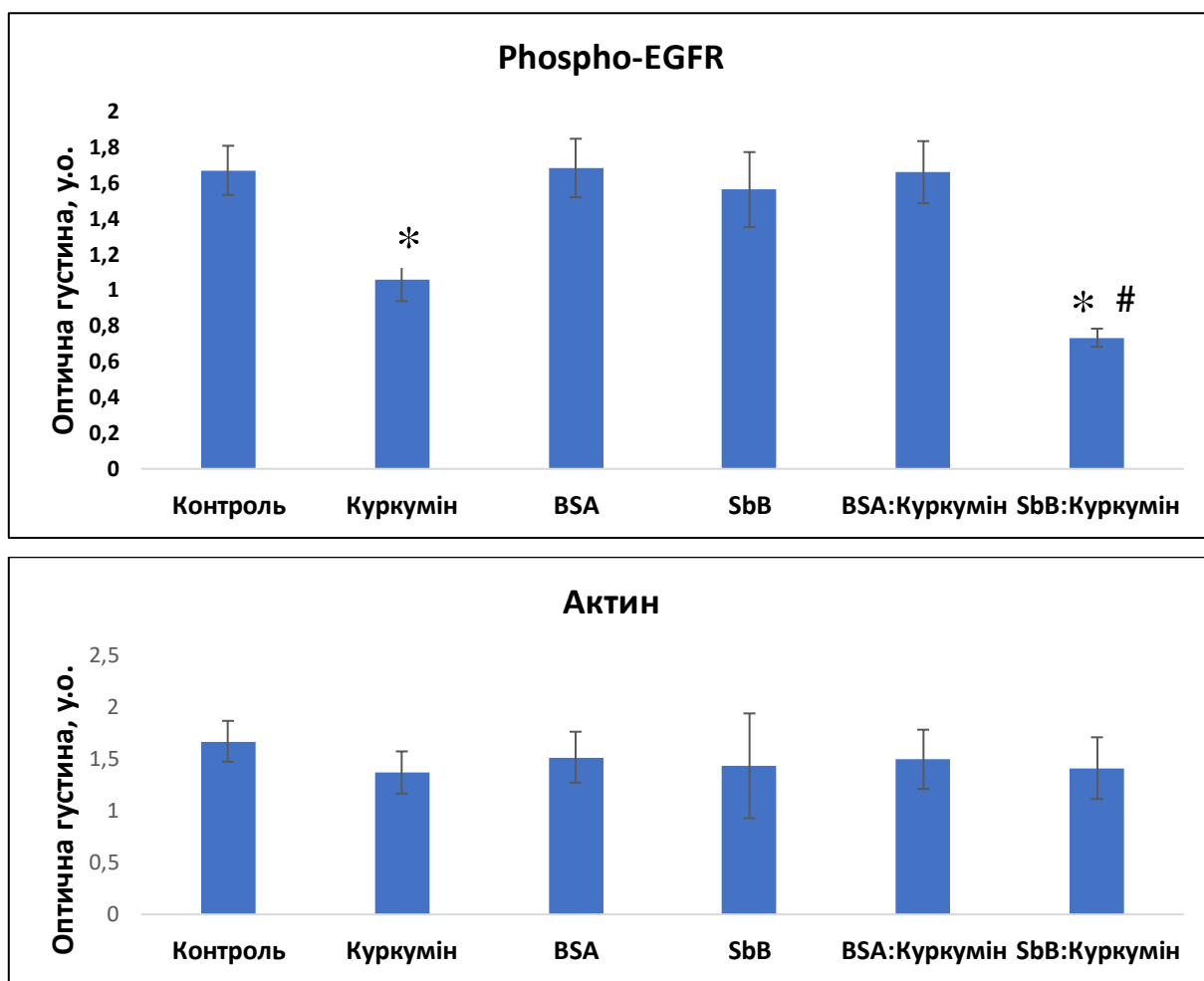


Рис. 3.23. Куркумін та його комплекси з SbB пригнічують фосфорилування рецептору EGFR у лізатах малігнізованих клітин лінії A431. Рівень актину використовували для нормалізації експериментальних даних. (куркумін - 0,5 мкг/мл, BSA та SbB - 5 мкг/мл. $M \pm m$; $n=4$, * - $p < 0,05$ (порівняно з контролем), # - $p < 0,05$ (порівняно з вільним куркуміном)).

Для вивчення цих шляхів ми використовували клітинну лінію A431 як модель адгезивних малігнізованих клітин з підвищеним рівнем експресії ргоНВ-EGF, високий рівень афінності до яких проявляє рекомбінантний носій куркуміну SbB. В нашому дослідженні був визначений вміст сигнальних протеїнів, які відіграють важливу роль у переключенні проапоптичних шляхів клітини, а саме Nf-kBp105, Akt-1, Phospho-Akt-1, Phospho-ErbB4, Phospho-EGFR.

Вміст основних сигнальних протеїнів був виміряний за допомогою твердофазного імуно-ензимного аналізу. Як антигени використовували лізати клітин A431, попередньо обробленими впродовж 24 годин куркуміном та його протеїновими комплексами у концентраціях 0,5 мкг/мл для куркуміну, для BSA та SbB - 5 мкг/мл.

Отримані результати (Рис. 3.23) демонструють статистично достовірні відмінності між вмістом Phospho-EGFR в лізатах клітин, попередньо оброблених куркуміном та його комплексами з протеїном SbB. Рівень актину, який використовувався як контроль протеїну з постійним рівнем експресії, статистично не відрізнявся для усіх варіантів обробки клітин. При дії на клітини куркуміну та його комплексів з SbB спостерігається суттєве зниження рівня Phospho-EGFR відносно контролю. У варіантні дії вільного куркуміну рівень Phospho-EGFR знизився на 36,54% відносно контролю (дія PBS). При дії комплексу SbB з куркуміном вміст Phospho-EGFR знизився на 56,34% відносно контролю та на 31,13% відносно дії вільного куркуміну. Отримані дані можуть розглядатися як доказ проапоптичної активності куркуміну, показаної у розділі 3.2 за допомогою визначення цитотоксичного впливу комплексів куркуміну з протеїнами та у розділі 3.3 за допомогою визначення рівня апоптозу (Аннексин V-FITC, флуорисценція якого була виміряна за допомогою протоевої цитофлуориметрії). У наших дослідженнях дія куркуміну та його комплексів як з BSA, так і з SbB не мала статистично достовірного впливу на вміст інших перевірених сигнальних протеїнів, а саме Nf-kBp105, Akt-1, Phospho-Akt-1, Phospho-ErbB4.

EGFR – це рецептор епідермального фактора росту (EGFR), який виконує роль рецепторної тирозинкінази, що належить до родини рецепторів ErbB. Його активація відповідними лігандами призводить до автофосфорилування специфічних залишків тирозину в цитоплазматичному домені EGFR цим самим ініціюючи сигнальні каскади, що беруть участь у проліферації, диференціації та міграції клітин [125]. На рисунку 3.25 представлена схема EGFR-залежного шляху сигнальної трансдукції, що

демонструє вплив Phospho-EGFR на виживуваність клітин та розвиток апоптозу.

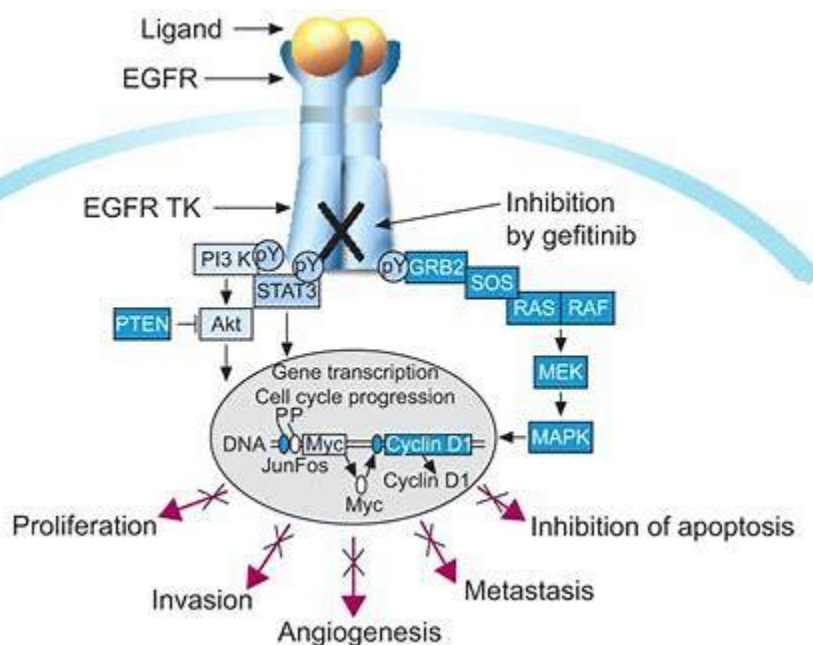


Рис. 3.24. Схема EGFR-залежного шляху сигнальної трансдукції [198].

Як видно зі схеми, представленої на Рис 3.24, активація EGFR може призводити до активації PI3-кінази, яка каталізує фосфорилування фосфоінозитидів плазматичної мембрани у 3'-положенні кільця інозиту. Зазначена модифікація призводить до формування зв'язувальних центрів для протеїнів, що містять PH-домени, таких як PDK1/PDK2 та Akt кінази, і, як наслідок актування останньої. Активована Akt-1 стимулює активацію mTor кінази, що в результаті призводить до посилення виживаності клітин [164, 197]. Паралельно з цим процесом підвищення активності Akt-1 призводить до посилення активності NF- κ B, а отже і збільшення рівня активації Bcl-2 та Bcl-xl, які є інгібіторами апоптозу [252].

За нашими даними, куркумін та його протеїнові комплекси з рекомбінантними похідними дифтерійного токсину, а саме SbB, знижують вміст та рівень активності EGFR, що призводить до зниження активації Akt-1. Негативна регуляція Akt-1 знижує виживуваність клітин та підсилює імовірність переходу клітин до апоптичного шляху. Таким чином, досліджувані комплекси можуть ефективно впливати на основні шляхи проапоптичних сигнальних шляхів.

3.3.6. Висновки до розділу

1. Ефективність взаємодії з поверхнею клітин для куркумінових комплексів з SbV зростає у 10 разів для клітин A431 та у 7,4 рази для клітин MDA-MB-231 порівняно з вільним куркуміном.
2. Протеїн-куркумінові комплекси мали у 6 разів триваліший період інтерналізації відносно незв'язаного куркуміну.
3. Рівень апоптозу переважає рівень некрозу при дії на клітинні лінії A431 та MDA-MB-231 як вільним куркуміном, так і його комплексами.
4. Комплекс куркуміну з В-фрагментом дифтерійного токсину підвищили рівень апоптозу у 5 разів для клітинної лінії A431 та у 2 рази для клітинної лінії MDA-MB-231.
5. Куркумін та його протеїнові комплекси з рекомбінантними похідними дифтерійного токсину SbV можуть ефективно впливати на ініціювання основних проапоптичних шляхів, зокрема, знижуючи рівень вмісту та активності Phospho-EGFR.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Куркумін – поліфенольна сполука, отримана з кореневищ рослини *Curcuma longa*, є біс- α,β -ненасичений β -дикетон і знаходиться в енольній рівновазі зі своїм таутомером [108]. Куркумін є перспективним фітохімічним агентом із доведеною протизапальною [175], проапоптотичною [132, 133], нейропротекторною [155], антипроліферативною [250] та протипухлинною [142], властивостями, що можуть посісти своє місце у медичній практиці у складі комплексної протипухлинної терапії [269]. Гідрофобність молекули куркуміну викликає низький рівень розчинності у воді, що є однією з причин зниженої біодоступності куркуміну в організмі людини. Окрім низького рівня розчинності швидкий катаболізм куркуміну [210, 248, 242] обмежує його використання у медичній практиці.

Багато наукових робіт присвячені пошуку різних способів підвищення біодоступності куркуміну. На сьогодні є спроби використання хімічних модифікацій молекули куркуміну [57, 75], везикулярні системи доставки на основі наночастинок [97, 114], транспорт в екзосомах [163] або міцелах [79], а також створення комплексів з протеїнами та іншими біомолекулами [237]. Носії на основі протеїнів для адресної доставки куркуміну до пухлинних клітин становлять практичний інтерес, оскільки можуть слугувати лігандами до рецепторів з підвищеним рівнем експресії на поверхні пухлинних клітин. Дифтерійний токсин (ДТ) є одним із найбільш вивчених природних цитотоксичних агентів зі специфічністю до асоційованого з пухлинними клітинами рецептора proHB-EGF (гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту) [81, 161, 218, 219], який на сьогодні є перспективним онкомаркером [157] і розглядається як потенційна мішень для доставки хіміопрепаратів. Специфічне зв'язування з proHB-EGF притаманне також природному мутанту ДТ, CRM197, що позбавлений каталітичної активності.

HB-EGF бере участь у прискоренні росту та прогресуванні пухлини, метастазуванні та ангіогенезі [144, 172], що може бути пояснене високим рівнем експресії proHB -EGF [165, 213], серед яких клітинна лінія

епідермоїдної аденокарцином A431 [222] і лінія аденокарциноми грудної залози MDA-MB-231 [67]. Специфічне пигнічення розчинної форми HB-EGF за допомогою моноклональних антитіл або дифтерійного анатоксину, таких як CRM197, широко вивчається як перспективний спосіб лікування деяких типів пухлинних захворювань людини, але все ще має низьку ефективність через недостатню цитотоксичну активність щодо малігнізованих клітин *in vivo* [27]. Нами було показано, що нативний ДТ, CRM197 та його рекомбінантний фрагмент SbB, що мають загальні трансмембранні домени, володіють пороутворювальною активністю без значної цитотоксичного впливу [204]. Таким чином дослідження утворення комплексів куркуміну з протеїновими носіями є одним з ефективних підходів для збільшення біодоступності куркуміну та підвищення специфічності його доставки до малігнізованих клітин.

В якості протеїнових носіїв для куркуміну нами було обрано два принципово різні протеїни – BSA як модель неспецифічного носія куркуміну [97, 238] та дифтерійний токсод CRM197 як специфічного переносника куркуміну за рахунок його високої спорідненості до proHB-EGF [109]. Першим етапом нашої роботи було дослідження принципової можливості створення комплексів куркуміну з обраними протеїновими носіями. BSA є широко розповсюдженим протеїновим носієм багатьох хіміопрепаратів різної природи, які на сьогодні широко використовуються в якості фармацевтичних препаратів [119, 238], тому нами було висунуто припущення щодо можливості його сорбції молекул куркуміна. CRM197 був обраний нами через свою специфічність до proHB-EGF, що робить можливим його практичне використання як агента цільової доставки куркуміну до пухлинних клітин, яким притаманна підвищений рівень експресії proHB-EGF. Базуючись на вищесказаному, ми припустили теоретичну можливість утворення комплексів куркуміну з обраними протеїнами, що може суттєво підвищити біодоступність та специфічність доставки куркуміну. Для дослідження цієї можливості нами було використано метод молекулярного докінгу, за допомогою якого було

продемонстровано *in silico* наявність двох можливих сайтів з'єднання куркуміну з BSA та один сайт з CRM197. Для BSA перший сайт зв'язування куркумін утворює за рахунок водневих зв'язків з Tyr138, Tyr161 і His146 молекули BSA. Другий спосіб зв'язування куркуміну характеризувався водневими зв'язками між Ser202, Ile290 і взаємодіями Pi-Pi з Trp214. Комплекс CRM197 з куркуміном стабілізувався шляхом утворення водневих зв'язків із взаємодіями Lys20, Gly18 і Pi-Pi між ароматичними частинами куркуміну та His17 і Tyr61 CRM197.

Надалі, отримані нами дані *in silico* були перевірені та підтверджені спектрофотометричним аналізом отриманих комплексів. Для цього нами були експресовані рекомбінатні протеїни (CRM197 та SbB, його B-фрагмент) у бактерійній культурі *E.coli* BL21 Rosetta (DE3), яка містить в собі плазмідну ДНК з вбудованим цільовим геном фрагменту ДТ. В результаті очистки за допомогою метало-афінної хроматографії на Ni^{2+} -NTA агарозі ми отримали рекомбінантні протеїни, охарактеризовані за допомогою ДСН-ПААГ електрофорезу. Згідно з електрофореграмою та порівнянням з амінокислотними послідовностями отриманих протеїнів ми дійшли висновку, що протеїни отримані у достатній кількості та достатнього рівня очистки.

Отримані протеїни використали для формування комплексів з куркуміном. Для доведення формування комплексів ми перевірили спектри поглинання вільного куркуміну та його комплексів з протеїнами у різних стехіометричних співвідношеннях. Обидва досліджуваних протеїни показали підвищення ефективності поглинання зі збільшенням концентрації куркуміну. Коли співвідношення насичення протеїнів куркуміном було досягнуто, подальшого збільшення ефективності поглинання не спостерігається, що предсталено у вигляді плато на графіку. На основі отриманих даних нами було розраховане молярне співвідношення, що становило 1:2,5 і 1:3 для BSA і куркуміну і CRM і куркуміну відповідно. Це дозволило нам зробити висновок, що спектральна поведінка комплексів може бути доказом стехіометрії комплексів куркуміну з BSA або CRM197. Ми можемо припустити, що більше

ніж одна молекула куркуміну може взаємодіяти з однією молекулою протеїну. Таким чином, було виявлено щонайменше два місця зв'язування куркуміну з BSA. Це було підтверджено спектральним аналізом, а також докінгом у SwissDock.

Наступним завданням після доведення можливості створення комплексів куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 було дослідження їх цитотоксичної активності та ролі у підвищені біодоступності куркуміну. Це дослідження відбувалося у кілька паралельних етапів.

Було перевірено вплив безпосередньо рекомбінантних протеїнів на клітини. У нашому експерименті використовувалися два варіанти нетоксичних похідних дифтерійного токсину (CRM197 та його фрагмент В) як перспективні носії молекул куркуміну та дві клітинні лінії малігнізованих клітин A431 та MDA-MB-231. Визначення IC_{50} для досліджуваних клітин демонструє безпеку використання обох нетоксичних похідних на відміну від дифтерійного токсину. IC_{50} для дифтерійного токсину складав $0,008 \mu\text{M} \pm 0,0002$ для MDA-MB231 і $0,001 \mu\text{M} \pm 0,0003$ для A431. Клітинна лінія A431 демонструє вищу чутливість до дифтерійного токсину через високий рівень експресії proHB-EGFR як сайту зв'язування з дифтерійним токсином. IC_{50} для CRM197 і SbB був на два порядки вищим, ніж для дифтерійного токсину для обох перевірених клітинних ліній. Це свідчить про те, що використання CRM197 і SbB є безпечним, тому обидва досліджених рекомбінантних похідних ДТ можуть застосовуватися для доставки ліків у медичній практиці.

Доведена безпека використання рекомбінантних протеїнів CRM197 та його В-фрагмента не виключає їх впливу на клітину, що не є цитотоксичним. Відомо, що токсичний ефект дифтерійного токсину може бути пов'язаний з каталітичною активністю С-домену ADP-рибозилтрансферази, який переноситься всередину клітини за допомогою утворення пори в плазмолемі [53, 138]. Нами було висунуте припущення, що дифтерійний токсин CRM197 також може володіти пороутворювальними властивостями. Для перевірки даної гіпотези було проведено два дослідження, що залучали визначення

провідності фосфатидилетаноламін-вміщуювальної бішарової мембрани (БЛМ) під дією різних блокаторів утворення пор – солей тіазолію з різною довжиною бічного ланцюга та вплив кон'югатів CRM197 з блокаторами на пухлинні клітини. Наші дослідження показали, що використання блокаторів зменшує електропровідність пор CRM197. Серед протестованих блокаторів найефективнішим був ОМГТ (8 атомів карбону у бічному ланцюзі). Блокатори НМГТ та ДМГТ з 9 та 10 атомами карбону у бічному ланцюзі відповідно, також показали значне зниження електропровідності БМЛ. Таким чином ці три блокатори були обрані для тестування на культурах клітин.

Спочатку була доведена відсутність цитотоксичного ефекту усіх блокаторів у робочих концентраціях (5 мкМ) на клітинах A431 та MDA-MB-231. Після цього було проведено дослідження цитотоксичності кон'югатів CRM197 з блокаторами на клітинах A431. Результати показали підвищення життєздатності клітин, оброблених кон'югатом з CRM197 НМГТ (10^{-7} мкг/мл) на 30% відносно дії вільного CRM197. Отримані дані свідчать про те, що незважаючи на незначний цитотоксичний ефект CRM197, даний протеїн проявляє свою пороутворювальну активність, що, безумовно, впливає на його властивості носія.

Наступним кроком після дослідження цитотоксичних на пороутворювальних властивостей рекомбінантного протеїну було проведено дослідження безпосередньо цитотоксичності вільного куркуміну. Нами було показано, що IC_{50} вільного куркуміну становила $32,8 \text{ мкМ} \pm 1,3$. Таке високе значення IC_{50} вільного куркуміну може бути пояснене його низькою розчинністю у воді та швидким руйнуванням молекули у водному середовищі [108, 116], а також швидким метаболізмом та окисненням куркуміну в клітині [147, 248]. Незважаючи на широкий спектр терапевтичних властивостей куркуміну, його низька цитотоксична активність *in vitro* унеможливилює практичне використання у медичній практиці

Детальне дослідження властивостей окремих компонентів комплексів (рекомбінантних протеїнів та вільного куркуміну) підвело нас до

оцінки цитотоксичного впливу комплексів на малігнізовані та немалігнізовані клітини. В якості моделі немалігнізованих клітин нами було обрані клітини лінії 4BL – активовані В-лімфоцити, які не проявили зниження життєздатності під впливом комплексів куркуміну ні в варіанті використання BSA як протеїнового носія, ні при використанні CRM197. Таким чином була доведена безпека використання комплексів щодо умовно нормальних клітин. Надалі, було проведене дослідження впливу комплексів на малігнізовані клітини. Нами були обрані суспензійні клітини Jurkat та дві лінії адгезивних клітин A431 та MDA-MB-231. Суспензійні клітини Jurkat, що мають низький рівень експресії proHB-EGF виявилися нечутливими до дії як вільного куркуміну та усіх запропонованих нами комплексів, тоді як адгезивні клітини обох протестованих ліній піддалися цитотоксичному впливу протеїн-куркумінових комплексів. Було продемонстровано, що життєздатність клітин MDA-MB-231 оброблених комплексами куркумін:BSA та куркумін:SbB, зменшувалася в 1,5 рази порівняно з впливом вільного куркуміну. Для клітинної лінії A431 пригнічення вільним SbB було незначним (23%), так само як і для клітин MDA-MB-231 (рівень життєздатності при обробці SbB залишався на рівні контролю), комплекс SbB з куркуміном знижував життєздатність MDA-MB-231 і A431 клітин на 49% і 71% відповідно. Вплив комплексів BSA з куркуміном не показав значного цитотоксичного ефекту на жодну з досліджених клітинних ліній, що робить його використання в специфічній протипухлинній терапії недоцільним, проте все ще не виключає BSA з перспективних носіїв куркуміну.

Останнім етапом дослідження цитотоксичного впливу протеїн-куркумінових комплексів було визначення їх IC_{50} , що проводилося на клітинній лінії MDA-MB 231. Як було зазначено вище, IC_{50} вільного куркуміну становила $32,8 \text{ мкМ} \pm 1,3$ на досліджуваній клітинній лінії. IC_{50} комплексів куркуміну становила $4,2 \text{ мкМ} \pm 0,006$ для CRM197 і $2,2 \text{ мкМ} \pm 0,005$ для SbB на малігнізованих клітинах MDA-MB-231. Це свідчить про те, що комплекси куркуміну з рекомбінантними протеїнами можуть бути ефективними засобами

доставки, здатними суттєво покращити біодоступність куркуміну та його специфічність доставки до малігнізованих клітин. Таким чином, комплекси куркуміну з нетоксичними рекомбінантними похідними ДТ можуть бути ефективною частиною комплексної протипухлинної терапії у випадку малігнізованих клітин зі збільшеним рівнем експресії proHB-EGF, що забезпечить адресну доставку куркумінових комплексів до клітин та підвищить імовірність досягнення терапевтичної дози.

Для дослідження можливості впровадження протеїну-куркумінових комплексів був проведений аналіз імуногенності рекомбінантних протеїнів як носіїв куркуміну. Отримані результати показали, що найсильніші імуногенні властивості характерні для токсоїду CRM197, тобто у відповідь на даний антиген формується найвищий титр антитіл, тоді як SbB проявив нижчий рівень імуногенності, що у свою чергу є підґрунтям для використання саме В-субодиниці як носія куркуміну, оскільки цей комплекс не викликає активної імунної відповіді та проявляє себе як більш безпечний при використанні *in vivo*.

Для пояснення значного цитотоксичного ефекту комплексів куркуміну з рекомбінантним білком SbB та практично відсутністю цитотоксичного впливу на малігнізовані клітини комплексом BSA з куркуміном було проведено дослідження ефективності взаємодії вільного куркуміну та його комплексів з поверхнею клітин за допомогою протокової цитофлуориметрії. Інтенсивність флуоресценції за куркуміном інтерпретувалася як ефективність його взаємодії з поверхнею клітин A431. Було показано, що інтенсивність флуоресценції збільшується принаймні в 6 і 10 разів для комплексів BSA з куркуміном та SbB із куркуміном відповідно відносно вільного куркуміну. Для клітинної лінії MDA-MB-231 рівень ефективності взаємодії з поверхнею клітини збільшувався в 5 та 7 разів для комплексів BSA з та SbB із куркуміном відповідно. Отримані результати дозволяють припустити, що ефективність взаємодії куркуміну з поверхнею клітини безпосередньо впливає на рівень його цитотоксичності.

Ще одним показником ефективності взаємодії куркуміну з поверхнею клітин є його поглинання клітинами та час інтерналізації протеїн-куркумінових комплексів, який було досліджено за допомогою конфокальної мікроскопії. На моделі клітинної лінії A431 було показано, що вільний куркумін перетинає клітинну мембрану та метаболізується вже впродовж перших 15 хвилин, тоді як комплекси куркуміну з протеїновими носіями стають повністю інтерналізованими та метаболізованими всередині клітини лише впродовж 90 хвилин. Сповільнене транспортування протеїн-куркумінового комплексу до клітини можна пояснити взаємодією SbB і CRM197 з proHB-EGF та, відповідно продуктивною індукцією апоптозу, визначення рівня якого було наступним нашим завданням. Отримані результати показали зниження життєздатності клітин MDA-MB 231 і A431 під дією протеїн-куркумінових комплексів. Немалігнізовані клітини лінії 4BL здебільшого не проявили рівня апоптозу, який суттєво б відрізнявся від значень контролю. Це можна пояснити як низькою біодоступністю вільного куркуміну, так і низьким рівнем експресії рецептора pro-HB-EGF. Таким чином, немалігнізовані клітини є нечутливими до запропонованих комплексів, що підтверджує безпеку використання комплексів в медичній практиці.

Високий рівень апоптозу, індукованого куркумін-протеїновими комплексами, не виключає існування інших типів клітинної загибелі, в першу чергу некрозу. Тому наступним етапом було дослідження шляху загибелі клітин під дією комплексів. Отримані нами дані демонструють рівні апоптозу та некрозу на рівні контролю при дії на клітини протеїнових носіїв - BSA та SbB. Подібну картину ми спостерігаємо і для контрольних проб. Натомість вплив комплексів куркуміну викликав загибель клітин в першу чергу апоптозом, тоді як некротичні клітини складали меншу частку, що було показано для обох протестованих малігнізованих клітин, а саме A431 та MDA-MB-231. Високий рівень апоптозу, що суттєво переважає рівень некрозу, є бажаним результатом застосування протипухлинних ліків, оскільки некроз може спровокувати численні пошкодження організму.

Заключним етапом даної роботи було дослідження можливих механізмів апоптозу, спричиненого дією куркуміну та його комплексів з BSA та SbB за допомогою визначення рівня експресії основних сигнальних протеїнів та їх активності клітинами A431. Наші результати демонструють різницю між вмістом Phospho-EGFR в клітинах під впливом куркуміну та його комплексами з SbB. У варіантні дії вільного куркуміну рівень Phospho-EGFR знизився на 36,54% відносно контролю. При дії комплексу SbB з куркуміном вміст Phospho-EGFR знизився на 56,34% відносно контролю та на 31,13% відносно дії вільного куркуміну. Отримані дані можуть розглядатися як доказ проапоптичної активності куркуміну. Зниження вмісту та рівню активності EGFR призводить до зниження активації Akt-1. Негативна регуляція Akt-1 знижує виживуваність клітин та підсилює імовірність переходу клітин до апоптичного шляху. Таким чином, досліджувані комплекси можуть ефективно впливати на основні шляхи проапоптичних сигнальних шляхів.

У підсумку можна додати, що комплекси куркуміну на обох типах протеїнів – неспецифічному BSA та специфічному CRM197 (та його суботиниці SbB) щодо пухлинних клітин з збільшеним рівнем експресії proHB-EGF є ефективними щодо малігнізованих клітин, безпечними для умовно нормальних клітин та стабільним у використанні. Все вищезазначене робить доцільним викоистання запропонованих комплексів куркуміну з протеїноами BSA, CRM197 та SbB як основу для створення комерційних фармацевтичних препаратів для використання у комплексній протипухлинній терапії.

ВИСНОВКИ

Таким чином, в ході дисертаційної роботи було одержано комплекси куркуміну з протеїнами BSA та нетоксичними похідними ДТ, а саме CRM197 та його В-фрагментом, детально досліджено та проаналізовано їх фізико-хімічні властивості й біологічні ефекти. Встановлено, що формування комплексів куркуміну з протеїнами дозволяє суттєво підвищити біодоступність досліджуваної сполуки природного походження та відкриває перспективи розробки фармакологічних засобів для використання у програмах комплексної терапії онкологічних захворювань.

1. Продemonстровано, що куркумін утворює стійкі комплекси з BSA та CRM197 за рахунок існування сайтів сорбції з молекулою BSA та з молекулою CRM197;
2. Виявлено, що рівень цитотоксичності та антипроліферативної активності куркумін-протеїнових комплексів був більше ніж на порядок вищим відносно дії вільного куркуміну;
3. Доведено, що протеїн-куркумінові комплекси не проявляють цитотоксичного впливу щодо немалігнізованих умовно нормальних клітин;
4. Виявлено, що біодоступність куркуміну у складі комплексів з куркуміном збільшується за рахунок підвищення розчинності, тоді як специфічність доставки куркуміну до малігнізованих клітин у складі комплексів з нетоксичним рекомбінантним похідним дифтерійного токсину збільшується за рахунок взаємодії з рецептором pro-HB-EGF на цих клітинах, що було визначено за збільшенням ефективності взаємодії куркуміну з поверхнею клітин та за рівнем інтерналізації комплексів;
5. Продemonстровано, що переважаючим шляхом загибелі малігнізованих клітин під дією куркумін-протеїнових комплексів був апоптоз;
6. Показано, що імуногенність нетоксичних похідних дифтерійного токсину зменшуються з їх розміром, що дозволяє пропонувати меншу

субодиницю SbB в якості носія куркуміну при створенні комерційних препаратів.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):363-398.
2. Aggarwal BB, Shishodia S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1030:434-441. doi:10.1196/annals.1329.
3. Ahmad N, Ahmad R, Naqvi AA, Alam MA, Ashafaq M, Iqbal Z, et al. Isolation, characterization, and quantification of curcuminoids and their comparative effects in cerebral ischemia. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2017; 40:133–46. doi: 10.1080/10826076.2017.1293549
4. Akkermans ,C Van der Goot AJ, Venema P, Van der Linden E, Boom RM. Properties of protein fibrils in whey protein isolate solutions: Microstructure, flow behaviour and gelation. *Int. Dairy J.* 2008, 18:1034–1042
5. Akkoç Y, Berrak Ö, Arısan ED, Obakan P, Çoker-Gürkan A, Palavan-Ünsal N. Inhibition of PI3K signaling triggered apoptotic potential of curcumin which is hindered by Bcl-2 through activation of autophagy in MCF-7 cells. *Biomed Pharmacother.* 2015;71:161-171. doi:10.1016/j.biopha.2015.02.029
6. Akopian HR, Huleiuk NL, Kushniruk VO, Mykytenko DO, Iatsyshyna AP, Lukash LL. *Tsitol Genet.* 2013;47(5):55-69.
7. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9
8. Al-Akayleh F, Al-Naji I, Adwan S. et al. Enhancement of Curcumin Solubility Using a Novel Solubilizing Polymer Soluplus. *J Pharm Innov.* 17, 142–154 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12247-020-09500-x>
9. Alavi F.; Momen S.; Emam-Djomeh Z.; Salami M., Moosavi-Movahedi AA. Radical cross-linked whey protein aggregates as building blocks of non-heated cold-set gels. *Food Hydrocoll.* 2018, 81: 429–441.
10. Albani JR, Vogelaer J, Bretesche L, Kmiecik D. Tryptophan 19 residue is the origin of bovine β -lactoglobulin fluorescence. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;91:144-150. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.015

11. Algate P., Baldrige, J., Mossman, S.. Antigen. Adjuvants: Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2007:27-37.
12. Ali I.; Haque A.; Saleem K. Separation and identification of curcuminoids in turmeric powder by HPLC using phenyl column. *Anal. Methods*. 2014, 6: 2526–2536
13. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*. 2007;4(6):807-818. doi:10.1021/mp700113r
14. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1590-1611. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.008
15. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. 2002;23(1):143-150. doi:10.1093/carcin/23.1.143
16. Araújo MC, Antunes LM, Takahashi CS. Protective effect of thiourea, a hydroxyl-radical scavenger, on curcumin-induced chromosomal aberrations in an in vitro mammalian cell system. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001;21(2):175-180. doi:10.1002/1520-6866
17. Ardebili A, Pouriayevali MH, Aleshikh S, et al. Antiviral Therapeutic Potential of Curcumin: An Update. *Molecules*. 2021;26(22):6994. doi:10.3390/molecules26226994
18. Arezki A, Chabot G, Quentin L, Scherman D, Jaouen G, Brulé E. Synthesis and biological evaluation of novel ferrocenyl curcuminoid derivatives. *Medchemcomm*. 2011;2(3):190-195. doi:10.1039/c0md00231c
19. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2002;57(1):41-52. doi:10.1023/a:1013106527829

20. Asai A, Miyazawa T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci.* 2000;67(23):2785-2793. doi:10.1016/s0024-3205(00)00868-7
21. Bandopadhyay S, Manchanda S, Chandra A, Ali J, Deb PK. Overview of different carrier systems for advanced drug delivery: in drug delivery systems. *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research.* 2020:179–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814487-9.00005-3>
22. Banožić M, Babi J, Joki S. Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste-a review. *Ind Crops Prod.* 2020, 144 (112009). doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112009
23. Baumann W, Rodrigues SV, Viana LM. Pigments and their solubility in and extractability by supercritical CO₂- The case of curcumin. *Braz. J. Chem. Eng.* 2000, 17:323–328. doi.org/10.1590/S0104-66322000000300008
24. Belcaro G, Cesarone MR, Dugall M, et al. Product-evaluation registry of Meriva, a curcumin-phosphatidylcholine complex, for the complementary management of osteoarthritis. *Pain Medicine.* 2010;52(2 Suppl 1):55-62.
25. Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, et al. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138⁺ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood.* 2004;103(8):3175-3184. doi:10.1182/blood-2003-06-2151
26. Brodkorb A, Croguennec T, Bouhallab S, Kehoe JJ. Heat-Induced denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. *In Advanced Dairy Chemistry. Springer: New York, NY, USA.* 2016:155–178. doi:10.1007/978-1-4939-2800-2_6
27. Bröker M, Costantino P, DeTora L, McIntosh ED, Rappuoli R. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologicals.* 2011 Jul;39(4):195-204. doi: 10.1016/j.biologicals.2011.05.004

28. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(2):533-540. doi:10.1006/bbrc.1995.1076
29. Bruzell EM, Morisbak E, Tønnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005;4(7):523-530. doi:10.1039/b503397g
30. Bulboacă, A.E.; Boarescu, P.M.; Bolboacă, S.D.; Blidaru, M.; Fes,tilă, D.; Dogaru, G.; Nicula, C.A. Comparative effect of curcumin versus liposomal curcumin on systemic pro-inflammatory cytokines profile, MCP-1 and RANTES in experimental diabetes mellitus. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 8961. Bulboacă AE, Boarescu PM, Bolboacă SD, et al. Comparative Effect Of Curcumin Versus Liposomal Curcumin On Systemic Pro-Inflammatory Cytokines Profile, MCP-1 And RANTES In Experimental Diabetes Mellitus. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:8961-8972. doi:10.2147/IJN.S226790
31. Camargo LEA, Brustolin Ludwig D, Tominaga TT, et al. Bovine serum albumin nanoparticles improve the antitumour activity of curcumin in a murine melanoma model. *J Microencapsul.* 2018;35(5):467-474. doi:10.1080/02652048.2018.1526340
32. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395-417. doi:10.1038/s41571-020-0341-y
33. Chang M, Wu M, Li H. Antitumor activities of novel glycyrrhetic acid-modified curcumin-loaded cationic liposomes in vitro and in H22 tumor-bearing mice. *Drug Deliv.* 2018;25(1):1984-1995. doi:10.1080/10717544.2018.1526227
34. Charoenchaitrakool M, Niamnuy C, Dittanet P, Chantes O, Chuangyang P. Statistical optimization for precipitation of bioactive compounds from

- extracted *Centella asiatica* using gas anti-solvent technique. *J Food Process Eng.* 2020, 43:e13318. doi: 10.1111/jfpe.13318
35. Chassagnez-Mendez AL, Correa NCF, Franca LF, Machado NT, Araujo ME. Mass transfer model applied to the supercritical extraction with CO₂ of curcumins from turmeric rhizomes. *Braz. J. Chem.* 2000, 17:315–322. doi:10.1590/S0104-66322000000300007
 36. Chatterjee P, Dutta SS, Chakraborty T. Tautomers and Rotamers of Curcumin: A Combined UV Spectroscopy, High-Performance Liquid Chromatography, Ion Mobility Mass Spectrometry, and Electronic Structure Theory Study. *J Phys Chem A.* 2022 Mar 17;126(10):1591-1604. doi: 10.1021/acs.jpca.1c08612
 37. Chaudhry GE, Md Akim A, Sung YY, Sifzizul TMT. Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. *Front Pharmacol.* 2022(10),13:842376. doi: 10.3389/fphar.2022.842376
 38. Chauhan M, Saha S, Roy A. Curcumin: A review. *J. Appl. Pharm. Res.* 2014, 2, 18–28.
 39. Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, Lee YJ, Chan KW, Hsu WL. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chem.* 2010,119:1346–1351. doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.011
 40. Chen FP, Liu LL, Tang CH. Spray-drying microencapsulation of curcumin nanocomplexes with soy protein isolate: Encapsulation, water dispersion, bioaccessibility and bioactivities of curcumin. *Food Hydrocoll.* 2020, 105, 105821. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105821
 41. Chen S, Quan DH, Sam G, Ozberk V, Wang XT, Halfmann P, Pandey M, Good MF, Kawaoka Y, Britton WJ, Rehm BHA. Assembly of Immunogenic Protein Particles toward Advanced Synthetic Vaccines. *Small.* 2023 Feb;19(8):e2205819. doi: 10.1002/smll.202205819

- 42.Chen TY, Chen DY, Wen HW, et al. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *PLoS One*. 2013;8(5):e62482. doi:10.1371/journal.pone.0062482
- 43.Chen X, Zhang T, Su W. et al. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death Dis*. 2022, 13:974. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>
- 44.Chen Y, Lu Y, Lee RJ, Xiang G. Nano Encapsulated Curcumin: And Its Potential for Biomedical Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:3099-3120.. doi:10.2147/IJN.S210320
- 45.Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol*. 1994;59(3):295-302. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x
- 46.Choe S, Bennett MJ, Fujii G, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*. 1992;357(6375):216-222. doi:10.1038/357216a0
- 47.Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016 Nov 1;2016(11). doi: 10.1101/pdb.prot087288
- 48.D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137
- 49.Das L, Vinayak M. Curcumin attenuates carcinogenesis by down regulating proinflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β) via modulation of AP-1 and NF-IL6 in lymphoma bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2014;20(1):141-147. doi:10.1016/j.intimp.2014.02.024
- 50.Dateoka S, Ohnishi Y, Kakudo K. Effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in oral cancer. *Med Mol Morphol*. 2012;45(2):91-97. doi:10.1007/s00795-011-0543-6
- 51.Degot P, Huber V, Hofmann E, Hahn M, Touraud D, Kunz W. Solubilization and extraction of curcumin from *Curcuma longa* using green, sustainable, and

- food-approved surfactant-free microemulsions. *Food Chem.* 2020, 336:127660. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127660
- 52.Deshpande SS, Ingle AD, Maru GB. Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. *Cancer Lett.* 1997;118(1):79-85. doi:10.1016/s0304-3835(97)00238-3
- 53.Donovan JJ, Simon MI, Draper RK, Montal M. Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(1):172-176. doi:10.1073/pnas.78.1.172
- 54.Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 2005;223(2):181-190. doi:10.1016/j.canlet.2004.09.041
- 55.El-Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):347-357. doi:10.1038/nrd3978
- 56.Elenitoba-Johnson KSJ, Lim MS. New Insights into Lymphoma Pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:193-217. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043803
- 57.El-Gazzar MG, Zaher NH, El-Hossary EM, Ismail AFM. Radio-protective effect of some new curcumin analogues. *J Photochem Photobiol B.* 2016;162:694-702. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.002
- 58.El-Saadony MT, Elsadek MF, Mohamed AS, Taha AE, Ahmed BM and Saad AM, Effects of chemical and natural additives on cucumber juice's quality, shelf life, and safety. *Foods*, 2020,9:639. <https://doi.org/10.3390/foods9050639>
- 59.Eltoum MSA, Elfaki AAM. Extraction, characterization, and usage of turmeric curcumin for color coating of metronidazole tablets. *Highlights BioSci.* 2020, 3:20206. doi: 10.36462/H.BioSci.20206

- 60.Erickson PS, Kalscheur KF. Nutrition and feeding of dairy cattle. *In Animal Agriculture; Academic Press: Cambridge, MA, USA.* 2020:157–180. DOI:10.1016/B978-0-12-817052-6.00009-4
- 61.Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(22):5308-5332. doi:10.1002/anie.201107724
- 62.Fais S, Logozzi M, Lugini L, et al. Exosomes: the ideal nanovectors for biodelivery. *Biol Chem.* 2013;394(1):1-15. doi:10.1515/hsz-2012-0236
- 63.Fang T, Tao Z, Liu Y, Yu C, Zhi R, Yu R. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2018;34(4):561-568. doi:10.13345/j.cjb.170333
- 64.Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
- 65.Garcea G, Jones DJ, Singh R, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer.* 2004;90(5):1011-1015. doi:10.1038/sj.bjc.6601623
- 66.Gautam SC, Gao X, Dulchavsky S. Immunomodulation by curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:321-341. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_14.
- 67.Ge X, Zhou Q, Zhang Y, Zhou W, Wu Y, Zhen C, Zhang M, Fan F, Chen G, Zhao J, Liu H. EGFR tyrosine kinase inhibitor HS-10296 induces autophagy and apoptosis in triplenegative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2020 Jul 30;40(7):981-987. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.07.10
- 68.Ghosh AK, Kay NE, Secreto CR, Shanafelt TD. Curcumin inhibits prosurvival pathways in chronic lymphocytic leukemia B cells and may overcome their stromal protection in combination with EGCG. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1250-1258. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1511

69. Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res.* 1984 May 25;12(10):4063-9. doi: 10.1093/nar/12.10.4063
70. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):787-809. doi:10.1016/j.bcp.2007.08.016
71. Gökdemir B, Baylan N, Çehreli S. Application of a novel ionic liquid as an alternative green solvent for the extraction of curcumin from turmeric with response surface methodology: determination and optimization study. *Analyt Lett.* 2020 53:2111–21. doi: 10.1080/00032719.2020.1730394
72. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue):W270-W277. doi:10.1093/nar/gkr366
73. Grynkiewicz G, Ślifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(2):201-212.
74. Guan F, Ding Y, Zhang Y, Zhou Y, Li M, Wang C. Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation *PLoS One.* 2016;11(1):e0146553. doi:10.1371/journal.pone.0146553
75. Guo Y, Jauregi P. Protective effect of β -lactoglobulin against heat induced loss of antioxidant activity of resveratrol. *Food Chem.* 2018;266:101-109. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.108
76. Guo Y, Wu R, Gaspar JM, et al. DNA methylome and transcriptome alterations and cancer prevention by curcumin in colitis-accelerated colon cancer in mice. *Carcinogenesis.* 2018;39(5):669-680. doi:10.1093/carcin/bgy043
77. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, et al. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat Prod Rep.* 2011;28(12):1937-1955. doi:10.1039/c1np00051a

- 78.Hardwick J, Taylor J, Mehta M, Satija S, Paudel KR, Hansbro PM, Chellappan DK, Bebawy M, Dua K. Targeting Cancer using Curcumin Encapsulated Vesicular Drug Delivery Systems. *Curr Pharm Des.* 2021;27(1):2-14. doi: 10.2174/1381612826666200728151610
- 79.Hassaniazad M, Inchehsablagh BR, Kamali H, Tousi A, Eftekhari E, Jaafari MR, Fathalipour M, Nikoofal-Sahlabadi S, Gouklani H, Alizade H, Nikpoor AR. The clinical effect of Nano micelles containing curcumin as a therapeutic supplement in patients with COVID-19 and the immune responses balance changes following treatment: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials.* 2020 Oct 22;21(1):876. doi: 10.1186/s13063-020-04824-y
- 80.He Y, Li W, Hu G, Sun H, Kong Q. Bioactivities of EF24, a Novel Curcumin Analog: A Review. *Front Oncol.* 2018;8:614. doi:10.3389/fonc.2018.00614
- 81.Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science.* 1991 Feb 22;251(4996):936-9. doi: 10.1126/science.1840698
- 82.Hoehle SI, Pfeiffer E, Solyom AM, Metzler M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J Agric Food Chem.* 2006;54(3):756-764. doi:10.1021/jf058146a
- 83.Hood JL, Wickline SA. A systematic approach to exosome-based translational nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012;4(4):458-467. doi:10.1002/wnan.1174
- 84.Hu YI, Lin X, Wang P, et al.CRM197 in combination with shRNA interference of VCAM-1 displays enhanced inhibitory effects on human glioblastoma cells. *J Cell Physiol.* 2015;230:1713-1728.
- 85.Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1988;48(21):5941-5946.

- 86.Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5292-5296. doi:10.1073/pnas.88.12.5292
- 87.Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-288. doi:10.1038/nrc776
- 88.Ingolfsson HI, Koeppe RE 2nd, Andersen OS. Curcumin is a modulator of bilayer material properties. *Biochemistry*. 2007;46(36):10384-10391. doi:10.1021/bi701013n
- 89.Ireson CR, Jones DJ, Orr S, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(1):105-111.
- 90.Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(55):8414-8427. doi:10.1038/sj.onc.1205947
- 91.Jefremov V, Zilmer M, Zilmer K, Bogdanovic N, Karelson E. Antioxidative effects of plant polyphenols: from protection of G protein signaling to prevention of age-related pathologies. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1095:449-457. doi:10.1196/annals.1397.048
- 92.Jia T, Zhang L, Duan Y, et al. The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):126. doi:10.1186/s12935-014-0126-4
- 93.Jiang S, Altaf Hussain M, Cheng J, Jiang Z, Geng H, Sun Y, Su C, Hou J. Effect of heat treatment on physicochemical and emulsifying properties of polymerized whey protein concentrate and polymerized whey protein isolate. *LWT–Food Sci. Technol.* 2018, 98, 134–140. doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.028
- 94.Jin H, Qiao F, Wang Y, Xu Y, Shang Y. Curcumin inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human non-small cell lung cancer cells through the

- upregulation of miR-192-5p and suppression of PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep.* 2015;34(5):2782-2789. doi:10.3892/or.2015.4258
95. Joe B, Lokesh BR. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1224(2):255-263. doi:10.1016/0167-4889(94)90198-8
 96. Kaberniuk AA, Oliynyk OS, Redchuk TA, Romaniuk SI, Kolybo DV, Komisarenko SV. Cloning of recombinant subunits of *Corynebacterium diphtheriae* diphtheria toxin and their expression in *Escherichia coli*. *Dopov. Nats. akad. nauk Ukr.* 2008:160–166.
 97. Kalanaky S, Hafizi M, Fakharzadeh S, et al. BCc1, the novel antineoplastic nanocomplex, showed potent anticancer effects in vitro and in vivo. *Drug Des Devel Ther.* 2015;10:59-70. doi:10.2147/DDDT.S89694
 98. Kalani A, Tyagi A, Tyagi N. Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):590-600. doi:10.1007/s12035-013-8544-1
 99. Kalani A, Tyagi N. Exosomes in neurological disease, neuroprotection, repair and therapeutics: problems and perspectives. *Neural Regen Res.* 2015;10(10):1565-1567. doi:10.4103/1673-5374.165305
 100. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):301-310. doi:10.1038/nrc780
 101. Kendall L. Production of Polyclonal Antibodies. In: C. Gary, ed., *Kaser Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*. 2-nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC. 2007; 41-66
 102. Kevij HT, Salami M, Mohammadian M, Khodadadi M. Fabrication and investigation of physicochemical, food simulant release, and antioxidant properties of whey protein isolate-based films activated by loading with

- curcumin through the pH-driven method. *Food Hydrocolloids*. 2020;108:106026. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106026
103. Khar A, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Varalakshmi CH, Anjum R, Kumari AL. Induction of stress response renders human tumor cell lines resistant to curcumin-mediated apoptosis: role of reactive oxygen intermediates. *Cell Stress Chaperones*. 2001;6(4):368-376. doi:10.1379/1466-1268(2001)006<0368:iosrrh>2.0.co;2
 104. Kim JM, Noh EM, Kwon KB, et al. Curcumin suppresses the TPA-induced invasion through inhibition of PKC α -dependent MMP-expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine*. 2012;19(12):1085-1092. doi:10.1016/j.phymed.2012.07.002
 105. Kim YJ, Lee HJ, Shin Y. Optimization and validation of high-performance liquid chromatography method for individual curcuminoids in turmeric by heat-refluxed extraction. *J Agric Food Chem*. 2013;61(46):10911-10918. doi:10.1021/jf402483c
 106. Klapper, L.N.; Kirschbaum, M.H.; Sela, M.; Yarden, Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv. Cancer Res*. 2000, 77, 25–79.
 107. Kolch W, Pitt A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(9):618-629. doi:10.1038/nrc2900
 108. Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*. 2019;24(16):2930. doi:10.3390/molecules24162930
 109. Kumar A, Das G, Bose B. Recombinant receptor-binding domain of diphtheria toxin increases the potency of curcumin by enhancing cellular uptake. *Mol Pharm*. 2014;11(1):208-217. doi:10.1021/mp400378x

110. Kunami N, Yotsumoto F, Ishitsuka K, et al. Antitumor effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.* 2011;31(7):2483-2488.
111. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol.* 2017;174(11):1325-1348. doi:10.1111/bph.13621
112. Kurmudle N, Kagliwal LD, Bankar SB, Singhal RS. Enzyme-assisted extraction for enhanced yields of turmeric oleoresin and its constituents. *Food Bioscience.* 2013;3:36-41. doi:10.1016/j.fbio.2013.06.001
113. Kuttan G, Kumar KB, Guruvayoorappan C, Kuttan R. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:173-184. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_6
114. Kuttikrishnan S, Siveen KS, Prabhu KS, et al. Curcumin Induces Apoptotic Cell Death via Inhibition of PI3-Kinase/AKT Pathway in B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol.* 2019;9:484. doi:10.3389/fonc.2019.00484
115. Kwak MK, Kensler TW. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;244(1):66-76. doi:10.1016/j.taap.2009.08.028
116. Kwang-Jin L, Hye-Jin Y, Sang-Won J, Jin-Yeul M. Solid-phase extraction of curcuminoid from turmeric using physical process method. *Korean J. Pharmacogn.* 2012;43(3):250-256.
117. Labyntsev AIu, Korotkevich NV, Manoïlov KIu, Kaberniuk AA, Kolibo DV, Komisarenko SV. *Bioorg Khim.* 2014;40(4):433-442. doi:10.1134/s1068162014040086
118. Lampe V, Milobedzka J. Studien über Curcumin. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft.* 1913;46(2):2235-2240. doi:10.1002/cber.191304602149

119. Laubach V, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger S, Zöller N. Extrinsic or Intrinsic Apoptosis by Curcumin and Light: Still a Mystery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):905. doi:10.3390/ijms20040905
120. Lener T, Gimona M, Aigner L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:30087. Published 2015 Dec 31. doi:10.3402/jev.v4.30087
121. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol*. 1996;6(3):402-406. doi:10.1016/s0959-440x(96)80061-3
122. Lev-Ari S, Starr A, Vexler A, et al. Inhibition of pancreatic and lung adenocarcinoma cell survival by curcumin is associated with increased apoptosis, down-regulation of COX-2 and EGFR and inhibition of Erk1/2 activity. *Anticancer Res*. 2006;26(6B):4423-4430.
123. Li M, Ma Y, Ngadi MO. Binding of curcumin to β -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. *Food Chemistry*. 2013;141(2):1504-1511. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.099
124. Li M, Ngadi MO, Ma Y. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chem*. 2014;165:29-34. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.115
125. Li M, Wei M, Jiang Z, et al. BRAF overexpression induces rampant glioma proliferation independent of phospho-EGFR expression. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23(6):893-899. doi:10.17219/acem/37332
126. Lin JK, Shih CA. Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1717-1721. doi:10.1093/carcin/15.8.1717
127. Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y. Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation

- of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*. 2009;16(10):916-922. doi:10.1016/j.phymed.2009.04.008
128. Liu W, Zhai Y, Heng X, et al. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target*. 2016;24(8):694-702. doi:10.3109/1061186X.2016.1157883
 129. Louie GV, Yang W, Bowman ME, Choe S. Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol Cell*. 1997;1(1):67-78. doi:10.1016/s1097-2765(00)80008-8
 130. Luan X, Sansanaphongpricha K, Myers I, Chen H, Yuan H, Sun D. Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(6):754-763. doi:10.1038/aps.2017.12
 131. Lukash LL, Iatsishina AP, Kushniruk VO, Pidpala OV. Reprogramming adult somatic human cells in vitro. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2011; 11: 493–8.
 132. Luo H, Vong CT, Chen H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine. *Chin Med*. 2019;14:48. Published 2019 Nov 6. doi:10.1186/s13020-019-0270-9
 133. Mackenzie GG, Queisser N, Wolfson ML, Fraga CG, Adamo AM, Oteiza PI. Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *Int J Cancer*. 2008;123(1):56-65. doi:10.1002/ijc.23477
 134. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci*. 2006;78(18):2081-2087. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.007
 135. Mahmoudi A, Kesharwani P, Majeed M, Teng Y, Sahebkar A. Recent advances in nanogold as a promising nanocarrier for curcumin delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2022;215:112481. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112481

136. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm.* 2007;330(1-2):155-163. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.09.025
137. Malito E, Bursulaya B, Chen C, et al. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5229-5234. doi:10.1073/pnas.1201964109
138. Mantovani RA, Furtado GD, Netto FM, Cunha RL. Assessing the potential of whey protein fibril as emulsifier. *Journal of Food Engineering.* 2018, 223:99-108. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.
139. Martarelli D, Pompei P, Mazzoni G. Inhibition of adrenocortical carcinoma by diphtheria toxin mutant CRM197. *Chemotherapy.* 2009;55(6):425-432. doi:10.1159/000264689
140. McClements DJ. Delivery by Design (DBD): a standardized approach to the development of efficacious nanoparticle- and Microparticle-Based delivery systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2017;17(1):200-219. doi:10.1111/1541-4337.12313
141. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release.* 2015;219:278-294. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.029
142. Ming T, Tao Q, Tang S, et al. Curcumin: An epigenetic regulator and its application in cancer. *Biomed Pharmacother.* 2022;156:113956. doi:10.1016/j.biopha.2022.113956
143. Minj S, Anand S. Whey proteins and its derivatives: bioactivity, functionality, and current applications. *Dairy.* 2020;1(3):233-258. doi:10.3390/dairy1030016
144. Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel

- targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci.* 2006;97(5):341-347. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00188.x
145. Mohammadian M, Salami M, Alavi F, Momen S, Emam-Djomeh Z, Moosavi-Movahedi AA. Fabrication and characterization of Curcumin-Loaded complex coacervates made of gum arabic and whey protein nanofibrils. *Food Biophysics.* 2019;14(4):425-436. doi:10.1007/s11483-019-09591-1
 146. Mohammadian M, Salami M, Moghadam M, Amirsalehi A, Emam-Djomeh Z. Mung bean protein as a promising biopolymeric vehicle for loading of curcumin: Structural characterization, antioxidant properties, and in vitro release kinetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2021;61:102148. doi:10.1016/j.jddst.2020.102148
 147. Mohammadian M, Salami M, Momen S, Alavi F, Emam-Djomeh Z, Moosavi-Movahedi AA. Enhancing the aqueous solubility of curcumin at acidic condition through the complexation with whey protein nanofibrils. *Food Hydrocolloids.* 2019;87:902-914. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.09.001
 148. Monton C, Settharaksa S, Luprasong C, Songsak T. An optimization approach of dynamic maceration of *Centella asiatica* to obtain the highest content of four centelloids by response surface methodology. *Revista Brasileira De Farmacognosia.* 2019;29(2):254-261. doi:10.1016/j.bjp.2019.01.001
 149. Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement JP. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):131-136. doi:10.1016/s0014-5793(01)02376-6
 150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
 151. Murugan P, Pari L. Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic

- rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;101(4):241-245. doi:10.1111/j.1742-7843.2007.00109.x
152. Mythri RB, Harish G, Dubey SK, Misra K, Bharath MM. Glutamoyl diester of the dietary polyphenol curcumin offers improved protection against peroxynitrite-mediated nitrosative stress and damage of brain mitochondria in vitro: implications for Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem.* 2011;347(1-2):135-143. doi:10.1007/s11010-010-0621-4
 153. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, et al. Pre-clinical study of BK-UM, a novel inhibitor of HB-EGF, for ovarian cancer therapy. *Anticancer Res.* 2014;34(8):4615-4620.
 154. Naseri S, Darroudi M, Aryan E, et al. The antiviral effects of curcumin nanomicelles on the attachment and entry of hepatitis C virus. *Iranian Journal of Virology.* 2017;11(2):29-35. <https://journal.isv.org.ir/article-1-342-en.html>
 155. Nebrisi EE. Neuroprotective Activities of Curcumin in Parkinson's Disease: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):11248. Published 2021 Oct 18. doi:10.3390/ijms222011248
 156. Ng SK, Nyam KL, Nehdi IA, Chong GH, Lai OM, Tan CP. Impact of stirring speed on β -lactoglobulin fibril formation. *Food Sci Biotechnol.* 2016;25(Suppl 1):15-21. doi:10.1007/s10068-016-0093-8
 157. Nguyen PV, Hervé-Aubert K, Chourpa I, Allard-Vannier E. Active targeting strategy in nanomedicines using anti-EGFR ligands - A promising approach for cancer therapy and diagnosis. *Int J Pharm.* 2021;609:121134. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121134
 158. Nicolai T, Britten M, Schmitt C. β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids.* 2011;25(8):1945-1962. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.006
 159. Norouzi S, Majeed M, Pirro M, Generali D, Sahebkar A. Curcumin as an Adjunct Therapy and microRNA Modulator in Breast Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(2):171-177. doi:10.2174/1381612824666171129203506

160. Nurjanah N, Saepudin E. Curcumin isolation, synthesis and characterization of curcumin isoxazole derivative compound. *AIP Conference Proceedings*. doi:10.1063/1.5132492
161. Ohana P, Matouk I, Amit D, Gilon M, Hochberg A. Toxin-Based Cancer gene therapy. *In: Elsevier eBooks*. 2014:107-122. doi:10.1016/b978-0-12-394295-1.00008-1
162. Omidi S, Kakanejadifard A. A review on biological activities of Schiff base, hydrazone, and oxime derivatives of curcumin. *RSC Adv*. 2020;10(50):30186-30202. doi:10.1039/d0ra05720g
163. Oskouie MN, Aghili Moghaddam NS, Butler AE, Zamani P, Sahebkar A. Therapeutic use of curcumin-encapsulated and curcumin-primed exosomes. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8182-8191. doi:10.1002/jcp.27615
164. Ouyang S, Zeng Q, Tang N, et al. Akt-1 and Akt-2 Differentially Regulate the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Controlling Proliferation of Thymus-Derived Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2019;202(5):1441-1452. doi:10.4049/jimmunol.1701204
165. Oyagi A, Hara H. Essential Roles of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor in the Brain. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2012, 18(10):803-810.
166. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999;401(6748):82-85. doi:10.1038/43466
167. Pabon HJJ. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*. 1964;83(4):379-386. doi:10.1002/recl.19640830407.
168. Pan K, Zhong Q, Baek SJ. Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules. *J Agric Food Chem*. 2013;61(25):6036-6043. doi:10.1021/jf400752a

169. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(4):486-494
170. Pandey A, Vishnoi K, Mahata S, et al. Berberine and Curcumin Target Survivin and STAT3 in Gastric Cancer Cells and Synergize Actions of Standard Chemotherapeutic 5-Fluorouracil. *Nutr Cancer.* 2015;67(8):1293-1304. doi:10.1080/01635581.2015.1085581
171. Park MY, Ha SE, Vetrivel P, et al. Differences of Key Proteins between Apoptosis and Necroptosis. *Biomed Res Int.* 2021;2021:3420168. doi:10.1155/2021/3420168
172. Park SH, Yoon SJ, Choi S, et al. Particulate matter promotes cancer metastasis through increased HBEGF expression in macrophages. *Exp Mol Med.* 2022;54(11):1901-1912. doi:10.1038/s12276-022-00886-x
173. Paulucci VP, Couto RO, Teixeira CCC, Freitas LAP. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Revista Brasileira De Farmacognosia.* 2013;23(1):94-100. doi:10.1590/s0102-695x2012005000117
174. Payton F, Sandusky P, Alworth WL. NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod.* 2007;70(2):143-146. doi:10.1021/np060263s
175. Peng Y, Ao M, Dong B, et al. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:4503-4525. doi:10.2147/DDDT.S327378
176. Pérez-Gago MB, Nadaud P, Krochta JM. Water Vapor Permeability, Solubility, and Tensile Properties of Heat-denatured versus Native Whey Protein Films. *Journal of Food Science.* 1999;64(6):1034-1037. doi:10.1111/j.1365-2621.1999.tb12276.x

177. Priyadarsini KI. Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2093-2100. doi:10.2174/138161213805289228
178. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C, Photochemistry Reviews.* 2009;10(2):81-95. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001
179. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules.* 2014;19(12):20091-20112. doi:10.3390/molecules191220091
180. Purkayastha S, Berliner A, Fernando SS, et al. Curcumin blocks brain tumor formation. *Brain Res.* 2009;1266:130-138. doi:10.1016/j.brainres.2009.01.066
181. Qi PX, Onwulata CI. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: effect of extrusion temperature. *J Agric Food Chem.* 2011;59(9):4668-4675. doi:10.1021/jf2011744
182. Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(4):537-543.
183. Rahimi Yazdi S, Corredig M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem.* 2012;132(3):1143-1149. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.019
184. Ramanjaneyulu, P.S., Sayi, Y.S., Raman, V.A. et al. Spectrophotometric determination of boron in nuclear grade uranium compounds with curcumin and studies on effect of HNO₃. *J Radioanal Nucl Chem.* 2007;274:109–114). <https://doi.org/10.1007/s10967-006-6913->.
185. Ranjan AP, Mukerjee A, Helson L, Vishwanatha JK. Scale up, optimization and stability analysis of Curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* 2012;10:38. doi:10.1186/1477-3155-10-38

186. Rao EV, Sudheer P. Revisiting curcumin chemistry part I: a new strategy for the synthesis of curcuminoids. *Indian J Pharm Sci.* 2011;73(3):262-270. doi:10.4103/0250-474X.93508
187. Ray B, Bisht S, Maitra A, Maitra A, Lahiri DK. Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc™) in the neuronal cell culture and animal model: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(1):61-77. doi:10.3233/JAD-2010-101374
188. Reddy AC, Lokesh BR. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food Chem Toxicol.* 1994;32(3):279-283. doi:10.1016/0278-6915(94)90201-1
189. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem.* 1992;111(1-2):117-124. doi:10.1007/BF00229582
190. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature.* 1999;401(6748):86-90. doi:10.1038/43474
191. Roy NK, Bordoloi D, Monisha J, et al. Specific Targeting of Akt Kinase Isoforms: Taking the Precise Path for Prevention and Treatment of Cancer. *Curr Drug Targets.* 2017;18(4):421-435. doi:10.2174/1389450117666160307145236
192. Rupert DLM, Claudio V, Lässer C, Bally M. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2017;1861(1 Pt A):3164-3179. doi:10.1016/j.bbagen.2016.07.028
193. Sahebkar A. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis. *Phytother Res.* 2014;28(5):633-642. doi:10.1002/ptr.5045

194. Sahne F, Mohammadi M, Najafpour GD, Moghadamnia AA. Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin. *Industrial Crops and Products*. 2017;95:686-694. doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.037
195. Sandvig K, Olsnes S. Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations. *J Biol Chem*. 1988;263(25):12352-12359.
196. Sato YT, Umezaki K, Sawada S, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep*. 2016;6:21933. doi:10.1038/srep21933
197. Schlein LJ, Thamm DH. Review: NF- κ B activation in canine cancer. *Vet Pathol*. 2022;59(5):724-732. doi:10.1177/03009858221092017
198. Segers VFM, Dugaucquier L, Feyen E, Shakeri H, De Keulenaer GW. The role of ErbB4 in cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(3):335-352. doi:10.1007/s13402-020-00499-4
199. Shan G, Zhang H, Jiang T. Correlation Coefficients for a Study with Repeated Measures. *Comput Math Methods Med*. 2020;2020:7398324. Published 2020 Mar 26. doi:10.1155/2020/7398324
200. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*. 2015;20(2):2728-2769. Published 2015 Feb 5. doi:10.3390/molecules20022728
201. Shao ZM, Shen ZZ, Liu CH, et al. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2002;98(2):234-240. doi:10.1002/ijc.10183
202. Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol*. 1976;25(15):1811-1812. doi:10.1016/0006-2952(76)90421-4

203. Shatursky OY, Manoilov KY, Gorbatiuk OB, et al. The geometry of diphtheria toxoid CRM197 channel assessed by thiazolium salts and nonelectrolytes. *Biophys J*. 2021;120(12):2577-2591. doi:10.1016/j.bpj.2021.04.028
204. Shatursky OY, Romanenko OV, Himmelreich NH. Long open amphotericin channels revealed in cholesterol-containing phospholipid membranes are blocked by thiazole derivative. *J Membr Biol*. 2014;247(3):211-229. doi:10.1007/s00232-013-9626-8
205. Shehzad A, Wahid F, Lee YS. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2010;343(9):489-499. doi:10.1002/ardp.200900319
206. Shen H, Shen J, Pan H, et al. Curcumin analog B14 has high bioavailability and enhances the effect of anti-breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2021;112(2):815-827. doi:10.1111/cas.14770
207. Shen L, Ji HF. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends Mol Med*. 2012;18(3):138-144. doi:10.1016/j.molmed.2012.01.004
208. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1056:206-217. doi:10.1196/annals.1352.010
209. Singh M, Hazra A, Bharitkar YP, et al. Synthesis of diversely substituted bis-pyrrolizidino/ thiopyrrolizidino oxindolo/acenaphthylene curcuminoids via sequential azomethine ylide cycloaddition. *RSC Adv*. 2018;8(34):18938-18951. doi:10.1039/c8ra02725k
210. Singh RK, Rai D, Yadav D, Bhargava A, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *Eur J Med Chem*. 2010;45(3):1078-1086. doi:10.1016/j.ejmech.2009.12.002

211. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-KB is suppressed by curcumin (Diferuloylmethane). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(42):24995-25000. doi:10.1074/jbc.270.42.24995
212. Sinjari B, Pizzicannella J, D'Aurora M, et al. Curcumin/Liposome Nanotechnology as Delivery Platform for Anti-inflammatory Activities via NFkB/ERK/pERK Pathway in Human Dental Pulp Treated With 2-HydroxyEthyl MethAcrylate (HEMA). *Front Physiol*. 2019;10:633. doi:10.3389/fphys.2019.00633
213. Siromolot AA, Krynina OI, Kolybo DV, Komisarenko SV. Antiproliferative and apoptotic effects of anti-human HB-EGF neutralizing polyclonal antibodies in vitro. *Experimental Oncology*. 2023;42(1):25-30. doi:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14145
214. Slika L, Patra D. A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2020;17(1):61-75. doi:10.1080/17425247.2020.1702644
215. Sneharani AH. Curcumin-sunflower protein nanoparticles-A potential antiinflammatory agent. *J Food Biochem*. 2019;43(8):e12909. doi:10.1111/jfbc.12909
216. Sohn SI, Priya A, Balasubramaniam B, et al. Biomedical Applications and Bioavailability of Curcumin-An Updated Overview. *Pharmaceutics*. 2021;13(12):2102. doi:10.3390/pharmaceutics13122102
217. Somers-Edgar TJ, Scandlyn MJ, Stuart EC, Le Nedelec MJ, Valentine SP, Rosengren RJ. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER alpha-breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2008;122(9):1966-1971. doi:10.1002/ijc.23328
218. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol*. 1994;46(12):1013-1016. doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03258.x

219. Sritharan S, Sivalingam N. Curcumin induced apoptosis is mediated through oxidative stress in mutated p53 and wild type p53 colon adenocarcinoma cell lines. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021;35(1):e22616. doi:10.1002/jbt.22616
220. Starok M, Preira P, Vayssade M, Haupt K, Salomé L, Rossi C. EGFR Inhibition by Curcumin in Cancer Cells: *A Dual Mode of Action. Biomacromolecules*. 2015;16(5):1634-1642. doi:10.1021/acs.biomac.5b00229
221. Stefan A, Conti M, Rubboli D, Ravagli L, Presta E, Hochkoeppler A. Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2011;156(4):245-252. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.08.024
222. Suman S, Priya R, Kameswaran M. Induction of different cellular arrest and molecular responses in low EGFR expressing A549 and high EGFR expressing A431 tumor cells treated with various doses of ¹⁷⁷Lu-Nimotuzumab. *Int J Radiat Biol*. 2020;96(9):1144-1156. doi:10.1080/09553002.2020.1793012.
223. Sun D, Zhuang X, Xiang X, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther*. 2010;18(9):1606-1614. doi:10.1038/mt.2010.105
224. Sun D, Zhuang X, Zhang S, et al. Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(3):342-347. doi:10.1016/j.addr.2012.07.002
225. Sun SH, Huang HC, Huang C, Lin JK. Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *Eur J Pharmacol*. 2012;690(1-3):22-30. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.036
226. Sun X, Gao C, Cao W, Yang X, Wang E. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine

- pretreated by solid-phase extraction. *J Chromatogr A*. 2002;962(1-2):117-125. doi:10.1016/s0021-9673(02)00509-5
227. Sun XD, Liu XE, Huang DS. Curcumin induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by inhibition of EGFR expression. *Mol Med Rep*. 2012;6(6):1267-1270. doi:10.3892/mmr.2012.1103
 228. Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, Koti BC, Manjula DV. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol*. 2012;44(1):73-77. doi:10.4103/0253-7613.91871
 229. Takenaka M, Ohkubo T, Okadome H, Sotome I, Itoh T, Isobe S. Effective Extraction of Curcuminoids by Grinding Turmeric (*Curcuma longa*) with Medium-chain Triacylglycerols. *Food Science and Technology Research*. 2013;19(4):655-659. doi:https://doi.org/10.3136/fstr.19.655
 230. Tan HK, Moad AI, Tan ML. The mTOR signalling pathway in cancer and the potential mTOR inhibitory activities of natural phytochemicals. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(16):6463-6475. doi:10.7314/apjcp.2014.15.16.6463
 231. Tang XH, Li H, Zheng XS, Lu MS, An Y, Zhang XL. CRM197 reverses paclitaxel resistance by inhibiting the NAC-1/Gadd45 pathway in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Med*. 2019;8(14):6426-6436. doi:10.1002/cam4.2512
 232. Tapal A, Tiku PK. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food Chemistry*. 2012;130(4):960-965. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.025
 233. Taulier N, Chalikian TV. Characterization of pH-induced transitions of beta-lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J Mol Biol*. 2001;314(4):873-889. doi:10.1006/jmbi.2001.5188
 234. Taverna S, Giallombardo M, Pucci M, et al. Curcumin inhibits in vitro and in vivo chronic myelogenous leukemia cells growth: a possible role

- for exosomal disposal of miR-21. *Oncotarget*. 2015;6(26):21918-21933. doi:10.18632/oncotarget.4204
235. Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci*. 1987;76(5):371-373. doi:10.1002/jps.2600760506
 236. Tønnesen HH, Karlsen J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1985;180(5):402-404. doi:10.1007/BF01027775
 237. Tremmel L, Rho O, Slaga TJ, DiGiovanni J. Inhibition of skin tumor promotion by TPA using a combination of topically applied ursolic acid and curcumin. *Mol Carcinog*. 2019;58(2):185-195. doi:10.1002/mc.22918
 238. Trinidad-Calderón PA, Varela-Chinchilla CD, García-Lara S. Natural Peptides Inducing Cancer Cell Death: Mechanisms and Properties of Specific Candidates for Cancer Therapeutics. *Molecules*. 2021;26(24):7453. doi:10.3390/molecules26247453
 239. Tripathy S, Verma DK, Thakur M, et al. Curcumin Extraction, Isolation, Quantification and Its Application in Functional Foods: A Review With a Focus on Immune Enhancement Activities and COVID-19. *Front Nutr*. 2021;8:747956. doi:10.3389/fnut.2021.747956
 240. Trochopoulos AGX, Zaharieva MM, Marinova MH, et al. Antineoplastic effect of a novel nanosized curcumin on cutaneous T cell lymphoma. *Oncol Lett*. 2020;20(6):304. doi:10.3892/ol.2020.1216
 241. Tsujioka H, Yotsumoto F, Hikita S, Ueda T, Kuroki M, Miyamoto S. Targeting the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in ovarian cancer therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011;23(1):24-30. doi:10.1097/GCO.0b013e3283409c91

242. Udeni Gunathilake TMS, Ching YC, Chuah CH. Enhancement of Curcumin Bioavailability Using Nanocellulose Reinforced Chitosan Hydrogel. *Polymers (Basel)*. 2017;9(2):64. doi:10.3390/polym9020064
243. Ullah MA, Johora FT, Sarkar B, Araf Y, Rahman MH. Curcumin analogs as the inhibitors of TLR4 pathway in inflammation and their drug like potentialities: a computer-based study. *J Recept Signal Transduct Res*. 2020;40(4):324-338. doi:10.1080/10799893.2020.1742741
244. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;106(Pt A):148-156. doi:10.1016/j.addr.2016.02.006
245. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 2016;115(4):431-441. doi:10.1038/bjc.2016.203
246. Vinante F, Rigo A, Papini E, Cassatella MA, Pizzolo G. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/diphtheria toxin receptor expression by acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 1999;93(5):1715-1723
247. Vogel, H.A.; Pelletier, J. Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharma* 1815, 2, 50.
248. Vyas A, Dandawate P, Padhye S, Ahmad A, Sarkar F. Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. *Curr Pharm Des*. 2013;19(11):2047-2069.
249. Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1978;43(2):86-92. doi:10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x
250. Walker BC, Mittal S. Antitumor Activity of Curcumin in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9435. doi:10.3390/ijms21249435

251. Wang JB, Qi LL, Zheng SD, Wu TX. Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009;10(2):93-102. doi:10.1631/jzus.B0820238
252. Wang L, Wang P, Liu Y, Xue Y. Regulation of cellular growth, apoptosis, and Akt activity in human U251 glioma cells by a combination of cisplatin with CRM197. *Anticancer Drugs*. 2012;23(1):81-89. doi:10.1097/CAD.0b013e32834b9b72
253. White EL, Ross LJ, Schmid SM, Kelloff GJ, Steele VE, Hill DL. Screening of potential cancer preventing chemicals for induction of glutathione in rat liver cells. *Oncol Rep*. 1998;5(2):507-512
254. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2011;10:12. doi:10.1186/1476-4598-10-12
255. Woo JH, Kim YH, Choi YJ, et al. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*. 2003;24(7):1199-1208. doi:10.1093/carcin/bgg082
256. Wu L, Guo L, Liang Y, Liu X, Jiang L, Wang L. Curcumin suppresses stem-like traits of lung cancer cells via inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep*. 2015;34(6):3311-3317. doi:10.3892/or.2015.4279
257. Xiong AW, Fang JM, Ren SX, et al. A Novel Combined Conjugate Therapeutic Cancer Vaccine, Recombinant EGF-CRM197, in Patients With Advanced Solid Tumors: A Phase I Clinical Study. *Front Oncol*. 2021;11:745699. doi:10.3389/fonc.2021.745699
258. Xue X, Yu JL, Sun DQ, et al. Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(9):3987-3992. doi:10.7314/apjcp.2014.15.9.3987

259. Yang CW, Chang CL, Lee HC, Chi CW, Pan JP, Yang WC. Curcumin induces the apoptosis of human monocytic leukemia THP-1 cells via the activation of JNK/ERK pathways. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:22. doi:10.1186/1472-6882-12-22
260. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;853(1-2):183-189. doi:10.1016/j.jchromb.2007.03.010
261. Yao Q, Ke ZQ, Guo S, et al. Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;124:26-34. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.10.004
262. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001;37. doi:10.1016/s0959-8049(01)00230-1
263. Ye Q, Ge F, Wang Y, et al. On improving bioaccessibility and targeted release of curcumin-whey protein complex microparticles in food. *Food Chem.* 2021;346:128900. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128900
264. Yim-im W, Sawatdichaikul O, Semsri S, et al. Computational analyses of curcuminoid analogs against kinase domain of HER2. *BMC Bioinformatics.* 2014;15(1):261. doi:10.1186/1471-2105-15-261
265. Yingngam B, Chiangsom A, Brantner A. Modeling and optimization of microwave-assisted extraction of pentacyclic triterpenes from *Centella asiatica* leaves using response surface methodology. *Ind Crops Prod.* 2020;147:112231. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112231
266. Zeng Y, Du Q, Zhang Z, et al. Curcumin promotes cancer-associated fibroblasts apoptosis via ROS-mediated endoplasmic reticulum stress. *Arch Biochem Biophys.* 2020;694:108613. doi:10.1016/j.abb.2020.108613.
267. Zheng B, McClements DJ. Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and

- Bioavailability. *Molecules*. 2020;25(12):2791.
doi:10.3390/molecules25122791
268. Zheng LD, Tong QS, Wu CH. Inhibitory effects of curcumin on apoptosis of human ovary cancer cell line A2780 and its molecular mechanism. *Ai Zheng*. 2002, 21, 1296-1300
269. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*. 2011;12(3):332-347. doi:10.2174/138945011794815356
270. Zhu L, Han MB, Gao Y, et al. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):1151-1156. doi:10.3892/mmr.2015.3450
271. Zhukova D, Katashynska D, Siromolot A, Romaniuk S, Kolybo D, Komisarenko S. Nontoxic diphtheria toxin derivatives CRM197 and B-fragment can serve as the means for targeted curcumin delivery into sensitive cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;96:105673. doi:10.1016/j.jddst.2024.105673
272. Zhukova D.A., Hrabovskyi O.O. Complexation of curcumin with BSA and CRM197. *Biothechnologia Acta*. 16, No. 6 , 2023, p. 62-67. <https://doi.org/10.15407/biotech16.06.076>

ДОДАТОК 1

СПИСОК

Публікацій за темою дисертації

Жукової Дарії Андріївни

1. Dariia Zhukova, Daryna Katashynska, Andrii Siromolot, Svitlana Romaniuk, Denys Kolybo, Serhiy Komisarenko. Nontoxic diphtheria toxin derivatives CRM197 and B-fragment can serve as the means for targeted curcumin delivery into sensitive cancer cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology. Volume 96, 2024, 105673, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105673>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224724003423>)
2. Zhukova D.A., Hrabovskyi O.O. Complexation of curcumin with bovine serum albumin and diphtheria toxoid CRM197. Biotechnologia Acta T. 16, No. 6, 2023, p. 62-67.
https://biotechnology.kiev.ua/images/BTA/2023/6_2023/Atamanchuk6_2023.pdf
Zhukova D.A. – проведення спектрофотометричних досліджень, написання тексту статті;
Hrabovskyi O.O. – проведення молекулярного докінгу.
3. Shatursky OY, Manoilo KY, Gorbatiuk OB, Usenko MO, Zhukova DA, Vovk AI, Kobzar OL, Triakash IO, Borisova TA, Kolibo DV, Komisarenko SV. The geometry of diphtheria toxoid CRM197 channel assessed by thiazolium salts and nonelectrolytes. Biophys J. 2021 Jun 15;120(12):2577-2591. doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.028. Epub 2021 May 1. PMID: 33940022; PMCID: PMC8390859.
4. Каташинська Д.О., Жукова Д.А., Манойлов К.Ю., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Нековалентні комплекси куркуміну з рекомбінантними похідними дифтерійного токсину як засоби доставки куркуміну в клітини. Український біохімічний конгрес 30 вересня-4

жовтня 2019. Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського.

5. Каташинська Д., Манойлов К., Жукова Д., Колибо Д., Комісаренко С. Рекombінантна субодиниця В дифтерійного токсину як засіб доставки куркуміну в ракові клітини. Біологічний факультет Львівського національного університету. квітень 9, 2019 – квітень 11, 2019