

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

ВПЛИВ КУРКУМІНУ НА АНТИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ АЛЬБУМІНУ

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Середюк Софії Іванівни

Науковий керівник від кафедри
д-р біол. наук, ст. наук. співроб.
Андрійчук Т.Р.

Робота виконана у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії
О.В. Палладіна НАН України під керівництвом ст. наук. співроб. відділу,
канд. біол. наук Сіромолота Андрія Андрійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– активні форми кисню;
ЛСА	людський сироватковий альбумін;
ОВА	– овальбумін;
МТТ	– 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід;
A431	– human epidermoid carcinoma cell line 431 (лінія клітин епідермоїдної карциноми людини 431);
АКТ	– АКТ serine/threonine kinase (серин/треонінкіназа АКТ);
AP-1	– activator protein 1 (активаторний білок-1);
EGFR	– epidermal growth factor receptor (рецептор епідермального фактора росту);
HEK293	– human embryonic kidney 293 cells (ембріональні клітини нирки людини 293);
NF-κB	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерний фактор κb);
STAT	– signal transducers and activators of transcription (перетворювачі сигналів та активатори транскрипції).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Цитотоксичні властивості молекули куркуміну та його комплексу з людським сироватковим альбуміном.....	7
1.1. Структура та фізико-хімічні властивості куркуміну.....	7
1.2. Властивості куркуміну та його дія на пухлинні клітини.....	10
1.3. Низька біодоступність куркуміну	16
1.4. Комплекс куркуміну і людського сироваткового альбуміну	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	23
2.1. Об'єкти дослідження.....	23
2.2. Електрофорез у поліакриламідному гелі.....	23
2.3. Спектрофотометрія.....	24
2.4. Флуоресценція утвореного комплексу куркуміну та людського сироваткового альбуміну	24
2.5. Культивування культур клітин та визначення цитотоксичності куркуміну за допомогою МТТ-тесту.....	26
2.6. Отримання комплексу куркуміну із ЛСА для імунізації мурчаків.....	28
2.7. Імунізація мурчаків підготовленими зразками і забір сироваток.....	28
2.8. Визначення робочого рівня вторинних антитіл кроля.....	29
2.9. Визначення рівня антитіл в сироватці крові імунізованих мурчаків у системі ELISA	30
2.10. Статистичний аналіз.....	31
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	32
3.1. Аналіз очищеного людського сироваткового альбуміну.....	32
3.2. Спектрофотометричний та флуоресцентний аналіз куркуміну та його комплексу з людським сироватковим альбуміном.....	34
3.3. Вплив комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном на малігнізовані та немалігнізовані клітини	42

3.4. Визначення імуногенності комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном у сироватках мурчаків	47
ВИСНОВКИ	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55

ВСТУП

Куркумін, основний активний компонент куркуми (*Curcuma longa*), є природним поліфенолом із широким спектром фармакологічних властивостей, включаючи протизапальну, антиоксидантну, протипухлинну та антимікробну дію [1]. Куркумін як регулятор апоптозу впливає на численні молекули-мішені, зокрема, блокуючи активність NF-κB, STAT, AP-1 та інших білків, що сприяють апоптозу у нормальних клітинах, і, навпаки, веде до індукції апоптозу в пухлинних клітинах. Це робить його перспективним агентом для терапії різних видів пухлин, таких як рак молочної залози, легенів, шлунка та простати, завдяки здатності пригнічувати ріст пухлин, метастазування та міграцію злоякісних клітин [2]. Куркумін підвищує антиоксидантні властивості клітин і знижує рівень активних форм кисню (АФК), що сприяє захисту клітин від окисного стресу та зменшенню апоптозу в нормальних або ушкоджених клітинах. Таким чином, його потенціал як протипухлинного засобу потребує подальшого вивчення для розробки ефективних терапевтичних стратегій [3]. Однак практичне застосування куркуміну обмежується його низькою біодоступністю через погану розчинність у полярних розчинниках та швидкий метаболізм.

Одним із способів вирішення цієї проблеми є створення комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном (ЛСА), який є основним транспортним білком крові. ЛСА здатний зв'язувати гідрофобні молекули, що підвищує їх розчинність та стабільність. Взаємодія куркуміну з ЛСА забезпечує покращену доставку до тканин-мішеней і підвищує період напіврозпаду куркуміну, що потенційно можна використати у терапії ракових захворювань [4].

Метою цієї роботи було оцінити властивості комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном (ЛСА), його імуногенність та цитотоксичний вплив на малігнізовані та немалігнізовані клітини.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Провести аналіз чистоти та структурний амінокислотний аналіз ЛСА для оцінки його здатності зв'язувати куркумін.
2. Проаналізувати методами спектрофотометрії та флуориметрії стабільність утвореного комплексу куркуміну з ЛСА.
3. Оцінити цитотоксичний вплив куркуміну, ЛСА та їх комплексу на малігнізовані та немалігнізовані клітинні лінії *in vitro*.
4. Дослідити імуногенність комплексу куркуміну з ЛСА, а також оцінити можливу перехресну реактивність антитіл у сироватках мурчаків (*Cavia porcellus*).

РОЗДІЛ 1

ЦИТОТОКСИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛЕКУЛИ КУРКУМІНУ ТА ЙОГО КОМПЛЕКСУ З ЛЮДСЬКИМ СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ

1.1. Структура та фізико-хімічні властивості куркуміну

Куркума – це дієтична добавка жовтого кольору, яку отримують з кореневища рослини *Curcuma longa*, із сімейства *Zingiberaceae*. Індія, Китай, Південно-Східна Азія та Латинська Америка – країни поширення цієї рослини [5]. Оскільки куркума має яскраво виражені смак та колір, то її використовують як спецію карі, як натуральний барвник (косметика, харчові продукти, текстиль) чи антимікробний засіб. У медицині Східної Азії цю рослину застосовували для лікування різних патологічних захворювань: загоєння ран, лікування респіраторних захворювань та дерматологічних розладів [6].

У куркумі виявлено біологічно активні поліфенольні сполуки, які отримали назву куркуміноїди (рис. 1.1).

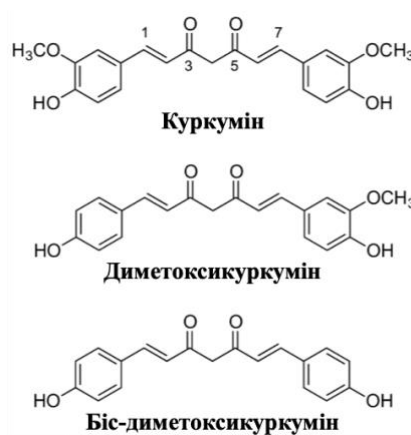


Рис. 1.1. Хімічна структура молекул куркуміноїдів куркуми (куркумін, диметоксикуркумін, біс-диметіоксикуркумін) [7]

Вони складають 2-15% від екстракту цієї рослини і включають три різні молекули: куркумін, диметоксикуркумін, біс-диметоксикуркумін [7].

Куркумін складає 15% від сухої маси *C. longa* та є його основним вторинним метаболітом. Вперше його виділили Vogel і Pellet [8] у 1815 році із кореневища. Загальний вміст куркуміну від усіх куркуміноїдів, отриманих з кореневища *Curcuma longa* Linn, складає 77%. Його молекулярна маса 368,38 о.а.м. і повна хімічна назва — 1,7-біс(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-1,6-гептадієн-3,5-діон. В основі цієї назви лежать три функціональні групи куркуміну: одна α , β -ненасичена β -дикетонова та дві ароматичні О-метоксифенольні групи [7]. Дикетони здатні утворювати стабільні еноли та депротонуються з утворенням енолатів.

Оскільки ця ізоформа куркуміну переважає серед куркуміноїдів і має широкий спектр біологічної активності, подальші теоретичні та експериментальні дослідження будуть зосереджені саме на ній.

У куркуміні є три реактивні центри: 2 гідроксильні групи, 2 α,β -ненасичені алкенові фрагменти та β -дикетонова група (рис. 1.2).

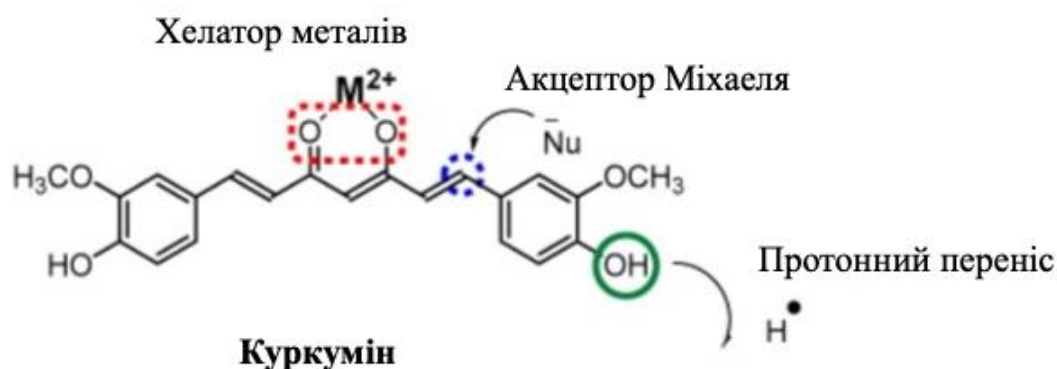


Рис. 1.2. Активні центри молекули куркуміну [14]

Перша з них – донор атомів водню, підвищує розчинність молекули у воді. Друга бере участь у двох процесах: як металохелатуючий агент утворює комплекси з кількома відомими іонами металів та як акцептор Міхаеля в реакціях нуклеофільного приєднання, які відбуваються між нуклеофілами

(такими як -OH, SH- та -SeH) та α,β -ненасиченими кетонними групами куркуміну (рис. 1.2) [9].

Куркумін може знаходитись у двох таутомерних формах: кето- та енольній (рис. 1.3).

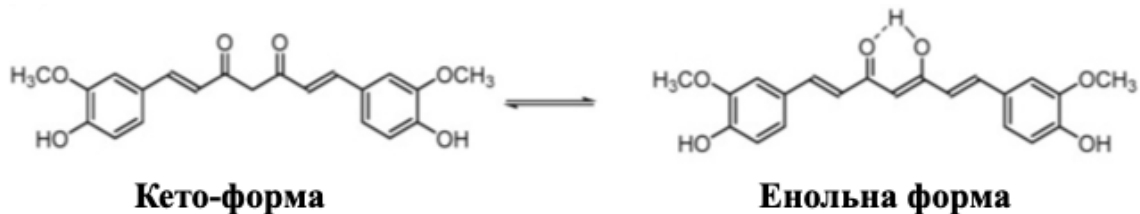


Рис. 1.3. Кето-енольні таутомери куркуміну [14]

Завдяки його ліпофільній природі, він легко розчинний у органічних розчинниках (етанол, метанол, диметилсульфоксид, ацетон) і зовсім не розчинний при кислому і нейтральному рН, за якого переважає кетоформа. Енольний таутомер присутній виключно у лужному середовищі через іонізацію гідроксильних груп. Однак під впливом концентрованих лужних розчинів молекула куркуміну втрачає стабільність і зазнає швидкої деградації [11].

За останні десятиліття було доведено терапевтичний потенціал куркуміну як протизапального, протидіабетичного, протиракового та омолоджуючого засобу за допомогою досліджень *in vitro*, *in vivo* та у клінічних випробуваннях [1, 3]. Окрім цього, куркумін продемонстрував перспективність у лікуванні ран, артрити та хвороби Альцгеймера [12, 13].

Проте терапевтичне застосування куркуміну обмежене низькою розчинністю у водних середовищах, слабкою біодоступністю та несприятливими фармакокінетичними характеристиками. Для подолання цих недоліків було розроблено низку спеціалізованих препаратів, що містять куркумін у комбінації з полімерними, ліпідними та наночастинковими носіями у відповідних співвідношеннях. Ці модифіковані форми активно досліджуються в численних наукових роботах (рис. 1.4) [14].

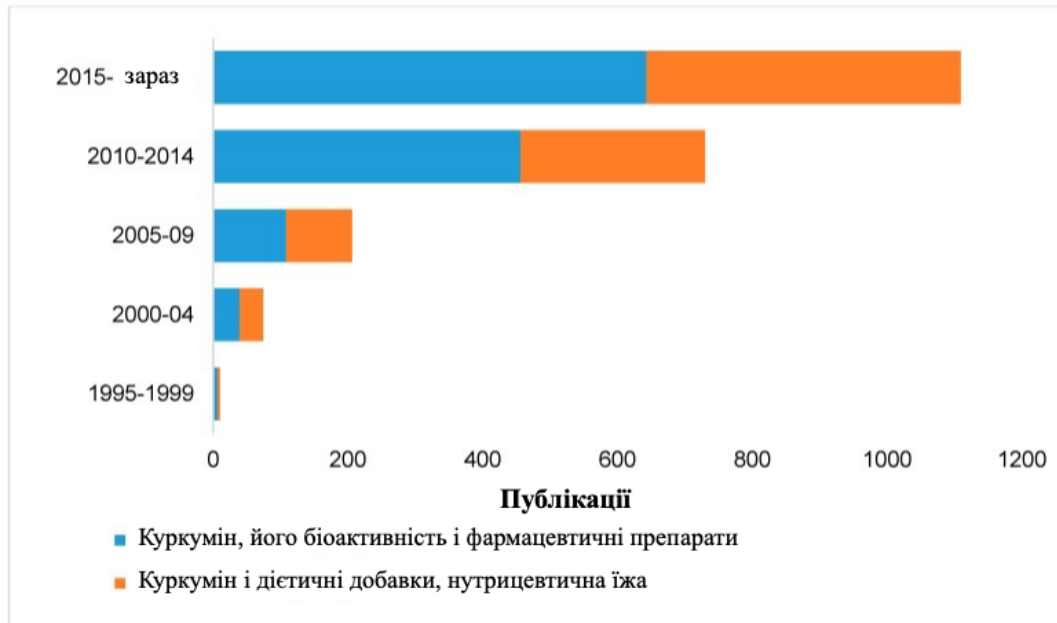


Рис. 1.4. Кількість нових публікацій, починаючи з 1995 року, про куркумін, його біологічну активність або фармацевтичні препарати на його основі, і куркумін у складі дієтичних добавок або нутрицевтичних харчових продуктів [14]

Важливо розуміти, як різні методи підготовки зразків та аналізу впливають на кількісне визначення, біодоступність, фармакокінетичні профілі та клінічну ефективність куркуміноїдів, що, в свою чергу, сприятиме кращому їхньому розумінню як потенційних терапевтичних агентів.

1.2. Властивості куркуміну та механізм його дії на пухлинні клітини

Куркумін володіє широким спектром біологічної активності за рахунок впливу на величезну кількість молекул-мішеней (рис. 1.5) [2]. Здебільшого, такий вплив приводить до індукування апоптозу, що є ключовим механізмом протипухлинної, антипроліферативної, імуномодулюючої та антибактеріальної дії цієї молекули.

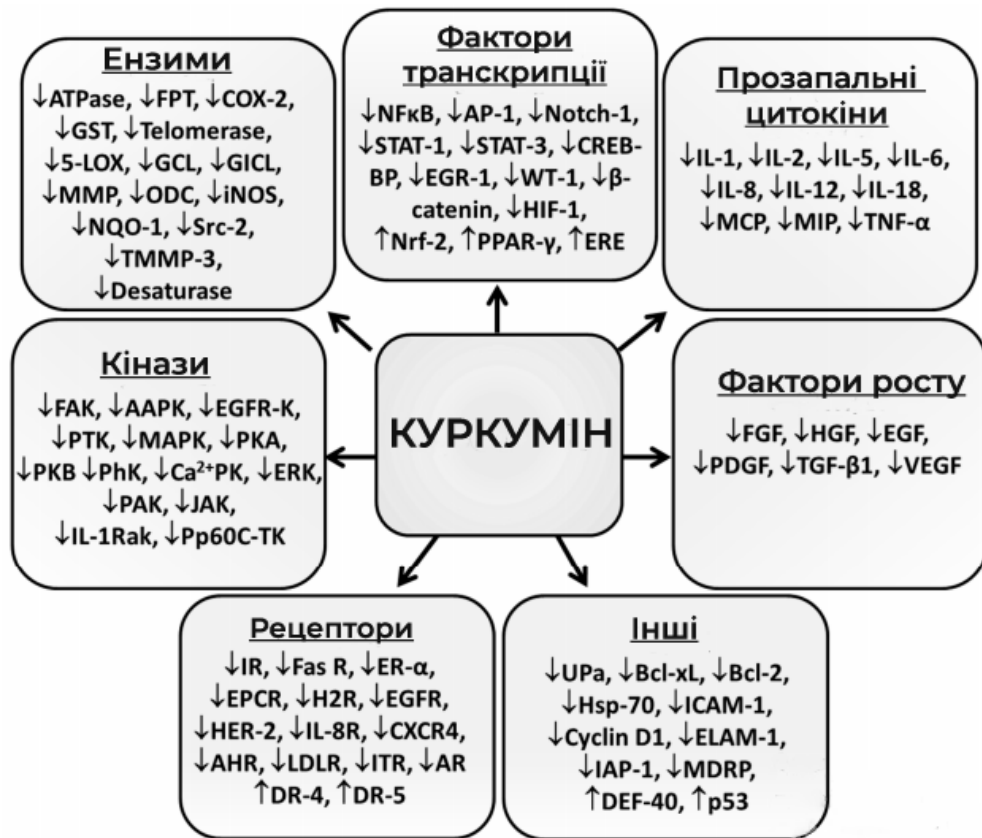


Рис. 1.5. Молекулярні мішені, на які впливає куркумін. Символ (↓) вказує на пригнічення активності, а символ (↑) – на її підвищення [15]

Куркумін здатний пригнічувати активацію ядерного фактора каппа В (NF-κB), який відповідальний за індукцію експресії різних прозапальних генів цитокінів та хемокінів, що запобігають апоптозу. Куркумін також негативно регулює білки перетворювачі сигналів та активатори транскрипції (STAT), які беруть участь в кліренсі імунної системи, регулюючи виживання клітин. Аналогічно, транскрипційний фактор активаторний білок-1 (AP-1), який, як відомо, пов'язаний з антиапоптотичними мітогенними генами, пригнічується куркуміном. Серин/треонінова протеїнкіназа Акт та мішень фосфатидилінозитол-3-кінази діють як супресори апоптозу, сприяючи активації NF-κB [16].

Окрім того, куркумін впливає на рівень цикліну D1 (транскрипційний ко-регулятор у розвитку раку) через інгібування NF-κB та наслідковому протираковому ефекту [17].

Втрата мембранного потенціалу, зниження рівня АТФ, підвищення проникності мембрани – ефекти куркуміну, які опосередковано впливають на транзйентні пори зовнішньої мембрани мітохондрій щурів. При цьому вивільняється цитохром *c*, активується каспаза 3, розщеплюється Bid і PARP, далі активується каспаза 8 – клітина йде за мітохондріальним шляхом індукції апоптозу, спричиненим дією куркуміну (25 мкМ) [18].

Оксидативний стрес, який виникає через надмірне утворення АФК, також є одним із активаторів апоптозу. По-перше, куркумін підвищує активність білка Nrf2, який регулює активність генів, відповідальних за детоксикацію молекул-електрофілів і АФК. По-друге, він, як ліпофільна молекула, здатний долати трансмембранний мітохондріальний бар'єр та збільшувати проникність для протонів, що веде до пошкодження балансу у ланцюзі перенесення електронів на мембрані мітохондрії. Як наслідок, збільшується кількість АФК – один із факторів цитотоксичності куркуміну [16].

Куркумін відіграє подвійну роль у запобіганні розвитку пухлин: з одного боку, він перешкоджає активації канцерогенних сполук на ранніх етапах, а з іншого – уповільнює ріст і поширення злякисних клітин, гальмуючи прогресування онкогенних процесів, при чому у різних органах (рис. 1.6) [5].

Рак молочної залози є найпоширенішою злякисною пухлиною серед жінок і основною причиною смертності від онкологічних захворювань. Куркумін демонструє значний потенціал у терапії цього захворювання. Він пригнічує проліферацію та інвазію клітин раку молочної залози через зниження активності NF-κB та рецептора епідермального фактору росту (EGFR) з тирозинкіназною активністю, а також блокує сигнальні шляхи PI3K/Akt/mTOR, що сприяє апоптозу та автофагії [19].

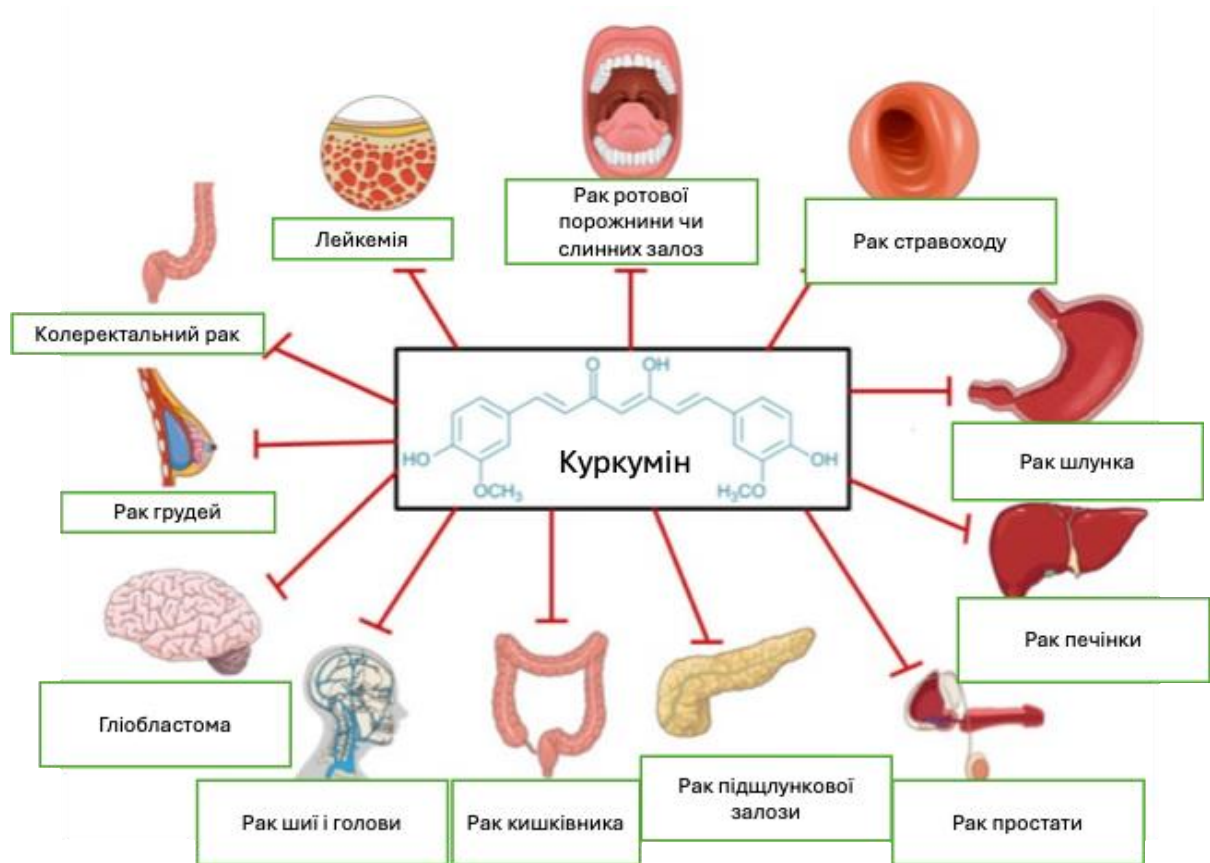


Рис. 1.6. Куркумін відіграє важливу роль у лікуванні багатьох видів раку [19]

Куркумін виявляє різноспрямовану дію на клітини раку молочної залози залежно від їхнього естрогенового статусу. В естроген-позитивних клітинах раку молочної залози MCF-7 куркумін знижує експресію генів естрогенового рецептора та трансформуючого фактору росту β ($TGF-\beta$), що пригнічує ріст пухлини. Водночас у високоінвазивних естроген-негативних клітинах MDA-MB-231 куркумін зменшує їхню здатність до проліферації, пригнічуючи MMP-2 та активуючи її антагоніста тканинного інгібітора металопротеїназ-1 (TIMP-1) [20]. Таким чином, куркумін демонструє потенціал як антипроліферативний і антиінвазивний агент у терапії раку молочної залози.

Крім того, куркумін впливає на експресію онкогенних і супресорних мікроРНК, довжиною 18–22 нуклеотидів, а саме онкогенні miR-19a та miR-19b та супресорні miR-15a, miR-16, miR-34a, miR-146b-5p і miR-181b, що сприяє гальмуванню пухлинного росту, метастазування та запуску

апоптозу [21]. Багатофункціональний механізм дії робить його перспективним засобом для комплексної терапії раку молочної залози.

Основною причиною смертності чоловіків від раку у світі є рак легенів. Куркумін має певні цитотоксичні ефекти, в першу чергу, знижуючи регуляцію NF-κB у клітинних лініях раку легенів людини A549, і також, пригнічуючи фосфорилазну активність JAK2, за допомогою впливу на сигнальний шлях JAK2/STAT3 [22].

При недрібноклітинному раку легенів людини куркумін пригнічував проліферацію пухлинних клітин та індукував їхній апоптоз шляхом збільшення відносної експресії miR-192-5p та пригнічення сигнального шляху PI3K/Akt – кіназ, які стимулюють ангіогенез, проліферацію та пригнічують апоптоз [23].

У клітинах аденокарциноми легень куркумін впливає на 3 антиапоптичні молекули: циклооксигеназу-2 (COX-2), EGFR та позаклітинно-сигнал-регульовану кіназу (ERK). Таким чином, він підвищує апоптоз та знижує виживання клітин аденокарциноми легень [24].

Такі захворювання як лейкемія, лімфома та множинна мієлома – це гематологічні пухлинні стани, пов'язані із патологічною трансформацією клітин кісткового мозку та крові. За хронічної лімфоїдної лейкемії куркумін сприяє апоптозу В-клітин шляхом зниження активності STAT3, AKT, NF-κB та інгібітора апоптозу, що належить до родини білків IAP (XIAP), який зв'язується із каспазами. Також при лейкемії куркумін пригнічує TNF-α-індуковану ядерну транслокацію NF-κB через інгібування фосфорилування та деградації IκBα у клітинах ML-1a [25].

У клітинах лімфоми Беркітта куркумін інгібує PI3K/AKT/NF-κB-шлях, що веде до апоптозу пухлинних В-клітин. Експресія IL-1α/IL-1β, основних прозапальних цитокінів, спричиняє наступну експресію метастатичних, ангіогенних генів та факторів росту. У мишей із лімфоною, яким *in vivo* вводили куркумін, останній впливав на зниження рівня прозапального цитокіну інтерлейкіну-1 через модуляцію транскрипційного фактору AP-1,

гіперактивація якого може сприяти виживанню пухлинних клітин і метастазуванню [26].

Множинна мієлома характеризується неконтрольованою проліферацією плазматичних клітин у кістковому мозку. Нещодавно повідомлялося, що куркумін значно пригнічує проліферацію клітин множинної мієломи, індукуючи апоптоз, залежний від концентрації та часу. За цим принципом він опосередковано пригнічує експресію ферменту епігенетичної регуляції генів EZH2 у клітинних лініях RPMI8226 та U266 через підвищення регуляції miR-101. І, навпаки, експресія EZH2 індукувала зниження експресії miR-101, що свідчить про інгібування за зворотним зв'язком біохімічної петлі шляху EZH2-miR-101 [27].

Що стосується використання куркуміну як фармпрепарату у лікуванні раку шлунка, було також доведено його цитотоксичну дію на пухлинні клітини. Це відбувається за механізмом інгібування антиапоптичних білків родини Bcl-2, підвищення експресії прокаспаз 3,8, 9, p53 і Вах, а також деполаризацію мембрани мітохондрій із виділенням цитохрому c, що запускає процес апоптозу [28].

Гліобластома є найпоширенішим типом злоякісного новоутворення у головному мозку, і становить 15% від усіх пухлин ЦНС. Такі методи, як застосування променевої терапії чи хірургічне втручання можуть призвести до шкідливих наслідків після лікування, через інфільтрацію ракових клітин у здоровий мозок. Куркумін є одним з альтернативних методів лікування, адже доведено його здатність проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр, що є лімітуючою стадією для багатьох протиракових препаратів. Наприклад, у клітинах злоякісної гліобластоми U-251 за дії куркуміну інгібується протеїнкіназа 1 (DAPK1) і спричиняється зупинка клітинного циклу на етапі G2/M. Куркумін викликає пригнічення NF-κB і STAT3 та активацію каспази-3 [29].

У 2017 році було проведено дослідження, у якому довели, що 2,9 мільйонів чоловіків тільки у США мають діагноз раку простати, який є

другою основною причиною смерті від раку серед чоловіків [30]. При двох типах раку простати людини: андрогеннезалежному (DU145) та андроген залежному (LNCaP), куркумін індукував прокапази-3 і -8, а також знижував експресію антиапоптичних генів Bcl-xL і Bcl2. Куркумін сприяв зниженню конститутивної активності фактора транскрипції NF-κB у клітинних лініях DU145, а також інгібував його індуковану активацію в клітинних лініях LNCaP, при цьому, стимулюючи TNF-індукований апоптоз. Це вказує на його здатність модулювати ключові сигнальні шляхи, залучені у виживанні пухлинних клітин [30].

Інші цитотоксичні властивості куркуміну полягають: у пригніченні NF-κB, COX-2, Wnt/β-катеніну при колоректальному раці; у інгібуванні гіпоксично-індукованого ангиогенезу шляхом зниження рівня HIF-1 та експресії MMP-9, а також у зменшенні кількості і розмірах пухлин у мишей із хімічно індукованим гепатокарциногенезом; у пригніченні NF-κB, STAT3, EGFR факторів, що інгібують апоптоз при раку підшлункової залози [29].

Отже, куркумін демонструє широкий спектр протипухлинної активності, що охоплює інгібування канцерогенезу, метастазування та міграції злоякісних клітин різного походження. Його вплив реалізується через множинні молекулярні механізми, основним із яких є активація апоптотичних процесів шляхом модуляції ключових сигнальних шляхів, що регулюють виживаність та проліферацію пухлинних клітин.

1.3. Низька біодоступність куркуміну

Попри те, що куркумін має широкий спектр біологічних властивостей, його біодоступність є зниженою, що ускладнює його застосування у розробці терапевтичних препаратів. Низька біодоступність куркуміну спостерігається не тільки на клітинному рівні, а й на організменному. Вона спричинена коротким періодом напіввиведення та низькою стабільністю у фізіологічних

умовах. Наприклад, при 37°C і нейтральному рН 7.2 період напіврозпаду куркуміну становить менше 10 хв [1].

Існує два шляхи деградації куркуміну: сольволіз і фотодеградація. Сольволіз є процесом, за якого молекули розчинника беруть участь у реакціях нуклеофільного заміщення або елімінації. У випадку куркуміну нуклеофільна атака спрямована на α , β -ненасичений кетонний фрагмент через механізм приєднання Міхаеля. В умовах водно-лужного буфера відбувається розщеплення гептадієнонового ланцюга куркуміну, що призводить до його 90% деградації з утворенням таких сполук, як ванілін, ферулова кислота та феруловий альдегід [14].

Другий шлях розпаду куркуміну – фотодеградація. Тобто куркумін є світлочутливим як у кристалічному стані, так і в розчині. При цьому він розпадається на ферулову кислоту, феруловий альдегід, ванілін та ванільну кислоту [14].

Nelson [1] вказує на те, що окрім терапевтичних властивостей куркумін також володіє і токсичністю. Таким чином він може впливати на канал HERG, цитохром P450 та глутатіон S-трансферазу. Пригнічення каналу HERG пов'язане з кардіотоксичністю; пригнічення цитохрому P450 і глутатіон-S-трансферази може призвести до порушення процесу детоксикації в клітинах і потенційних токсичних протипоказань до застосування інших лікарських засобів.

Також повідомляється, що куркумін має високу цитотоксичність щодо нормальних лімфоцитів людини. Він показав значення IC₅₀ 31 мкМ на клітинній лінії мишачих макрофагів (J774.1) і 15,2 мкМ на людських ембріональних ниркових клітинах (НЕК 293Т) [31].

Фармакокінетику куркуміну у мишей порівнювали за допомогою перорального або внутрішньочеревного введення [32]. При пероральному введенні куркуміну в дозі 0,1 г/кг максимальна концентрація у плазмі становила 0,22 мкг/мл і спостерігалася через 1 год після введення, проте вже через 6 год рівень куркуміну знижувався до значень нижче 5 нг/мл. Водночас

при внутрішньочеревному введенні тієї ж дози пікова концентрація досягала 2,25 мкг/мл, при цьому швидко зменшувалася протягом години.

Аналіз тканинного розподілу показав, що найвищі рівні куркуміну накопичувалися у кишечнику (>100 мкг/г), тоді як у селезінці та печінці його вміст становив 26,1 мкг/г та 26,9 мкг/г, відповідно. У нирках зафіксовано концентрацію 7,5 мкг/г, а в мозковій тканині – 0,4 мкг/г [32].

Дослідження, проведене на щурах, показало, що при внутрішньовенному введенні 10 мг/кг концентрація куркуміну у сироватці досягала $0,36 \pm 0,05$ мкг/мл. Для порівняння, при пероральному введенні значно вищої дози (500 мг/кг) цей показник становив $0,06 \pm 0,01$ мкг/мл [33].

Таким чином, ефективність системного надходження куркуміну значною мірою залежить від шляху введення. Пероральне застосування демонструє суттєво нижчу біодоступність порівняно з парентеральними методами, що може бути зумовлено швидким метаболічним перетворенням та обмеженою абсорбцією у шлунково-кишковому тракті.

Підвищення біодоступності куркуміну залишається актуальною задачею, і в цьому напрямі досліджується низка інноваційних підходів. Зокрема, перспективними є хімічні модифікації молекули куркуміну, використання наноструктурованих везикулярних систем доставки, застосування екзосом, а також включення у міцелярні структури [34 – 37]. Крім того, створення стабільних комплексів куркуміну з білками та іншими біомолекулами дозволяє значно покращити його розчинність і стабільність [38]. Серед усіх цих варіантів особливу увагу привертають білкові платформи, орієнтовані на таргетовану доставку до пухлинних клітин. Такий підхід ґрунтується на здатності природних поліпептидних лігандів взаємодіяти з певними онкоспецифічними рецепторами, що відкриває широкі можливості для селективної терапії.

1.4. Комплекс куркуміну і людського сироваткового альбуміну

ЛСА є одним з найпоширеніших білків у плазмі крові людини і виконує роль у транспорті широкого спектра сполук, зокрема фармакологічно активних речовин [39]. Механізм їхнього перенесення полягає в утворенні специфічних ліганд-білкових комплексів, ефективність утворення яких залежить від констант асоціації, кількості та просторової локалізації сайтів зв'язування на поверхні білкової молекули ЛСА. Таким чином, білок захищає куркумін від ферментативного розщеплення чи метаболічної трансформації, водночас, змінюючи мікрооточення довкола себе. Характер таких змін залежить як від хімічної природи ліганду, так і від його кислотного стану, що обумовлює специфіку процесів гетероасоціації.

Доведено, що наночастинки ЛСА, навантажені куркуміном, показали підвищену протипухлинну дію *in vivo* порівняно з контрольним куркуміном, без токсичності в моделі ксенотрансплантації пухлини у тварин [14]. На лініях раку молочної залози Thadakarally [41] виявили, що наночастинки ПЕГ-ЛСА-куркумін чинять виражену протиракову дію, а також мають кращу розчинність і стабільну тривалу циркуляцію. Що стосується цитотоксичності до клітин, Kim [42] повідомили, що наночастинки паклітакселу/куркуміну у комплексі з ЛСА ефективно проникають в клітини MIA Paca-2 і демонструють підвищення IC50 на 71% порівняно з наночастинками тільки паклітакселу і ЛСА, що може бути ефективно використано в протираковій комбінованій терапії.

Транспортні властивості ЛСА обумовлені його глобулярною тривимірною структурою, яка складається з поліпептидного ланцюга із 585 амінокислотних залишків. Його три структурно гомологічні домени (I, II і III) на 67% набувають форму α -спіралі. Кожен з доменів в свою чергу поділяється на два субдомени (A і B) і саме субдомени II A (сайт I) і III A (сайт II) – це основні сайти зв'язування ЛСА [39]. Відомо, що гетероциклічні аніони із зарядом, розташованим у центрі молекули, переважно

розміщуються на сайті I, при цьому ароматичні карбонові кислоти з витягнутою конформацією і негативним зарядом, розташованим на одному з кінців молекули, приєднуються до сайту II.

Доведено, що кверцетин, який є флавоноїдом, здатен зв'язуватися із ЛСА плазми крові на 99%. Він так само як і куркумін має у своєму складі фенольні гідроксильні групи. Першим чином, молекули флавоноїдів потрапляють у гідрофобну порожнину в субдомені II A в результаті гідрофобної взаємодії. Далі при їхньому депротонуванні між білком та лігандом виникають електростатичні взаємодії. Окрім них, зв'язок формується водневими взаємодіями – між фенольними гідроксильними групами препарату та поліпептидним ланцюгом або полярними залишками амінокислот, що призводить до перебудови поліпептидних карбонільних водневих зв'язків і, як наслідок, до скорочення компонента вторинної структури α -спіралі ЛСА [42].

Для дослідження механізмів взаємодії куркуміну з ЛСА Holovko [43] було проведено молекулярний докінг за допомогою програмного забезпечення Autodock 4.2 (рис. 1.7. А). У процесі моделювання структура білкової молекули залишалася жорстко фіксованою, тоді як конформація молекули куркуміну вважалася гнучкою через наявність 10 зв'язків із обертальними ступенями свободи. Результати докінгу показали, що молекула куркуміну у сформованому комплексі оточена залишками різних амінокислот. Це свідчить про участь у зв'язуванні як полярних, так і неполярних амінокислот та вказує на наявність різних типів зв'язків у комплексі (рис.1.7, Б) .

Експериментальні дослідження флуоресценції у водних розчинах ЛСА з додаванням куркуміну засвідчили суттєве гасіння флуоресценції при підвищенні концентрації ліганду за різних температур: 293, 303 та 313 К [43].

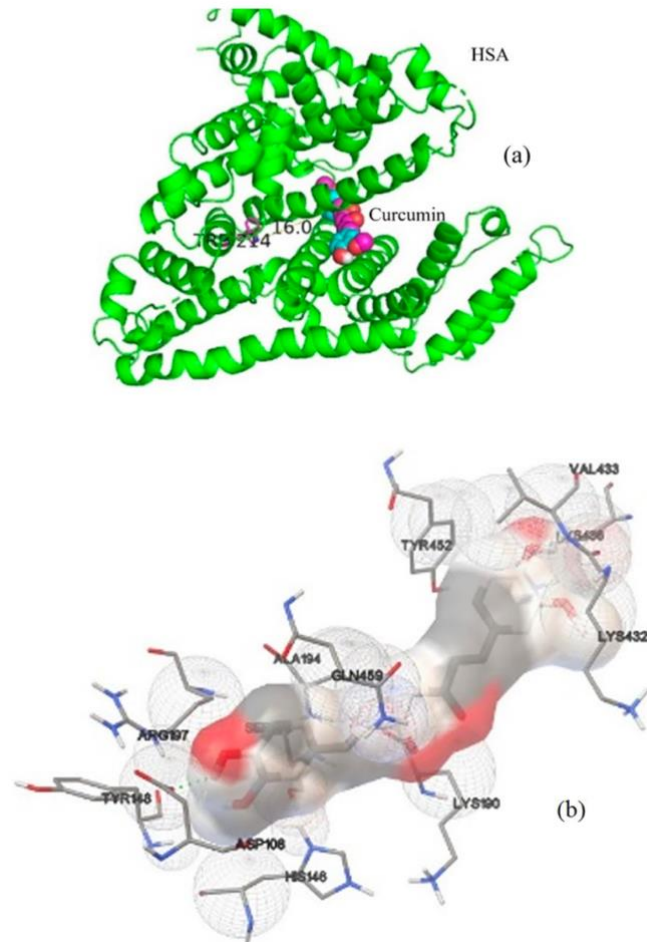


Рис.1.7. а – молекулярний комплекс ЛСА-куркумін із зазначеною в Å відстанню до триптофану Trp-214; б – найближче амінокислотне оточення куркуміну із зазначеними водневими зв'язками (зелений пунктир) у місці зв'язування [43]

Механізм переносу енергії в комплексі відбувається відповідно до моделі резонансного переносу енергії за Фьорстером (FRET), в якій флуорофор Trp-214 у ЛСА виконує роль донора, молекула куркуміну – акцептора, а обчислена відстань між ними складає 1,6 нм, що добре узгоджується з результатами, отриманими в ході молекулярного моделювання [42].

Куркумін демонструє максимум поглинання при 430 нм в метанолі та 415-420 нм в ацетоні, у лужному середовищі (рН > 10) він повністю депротонований і показує максимум поглинання при 467 нм. Його рКа

дорівнює 8,54. Куркумін також володіє трьома лабільними протонами при нейтральному рН, з яких один є енольним, а два – фенольними [44].

Liі [45] реєстрували спектри флуоресцентної емісії ЛСА в присутності різних концентрацій куркуміну при збудженні 295 нм. Вони довели, що сам ЛСА має сильну флуоресцентну емісію при 343 нм, при цьому додавання різних концентрацій куркуміну спричиняло помітне зменшення інтенсивності флуоресценції ЛСА із супутнім зсувом вліво на 7 нм. Таке сильне гасіння флуоресценції залишку триптофану і зсув піку емісії вказують на те, що конформація ЛСА може змінюватися і що в комплексі відбулася міжмолекулярна передача енергії. Це також вказує на те, що хромофор ЛСА перемістився в більш гідрофобне середовище і, відповідно, конформація білка змінилася [45].

Зміна конформації ЛСА потенційно може привести до зміни його антигенності за рахунок відкриття чи закриття антигенних детермінант, виникнення нових епітопів чи зміни імуногенності. Це, в свою чергу, впливає на імунну безпечність препарату, а також може пояснити алергічні реакції або непередбачувану імунну відповідь при терапії куркуміном у комплексі з ЛСА. Поки механізми впливу куркуміну на імунобіологічні властивості транспортних білків, зокрема ЛСА, залишаються недостатньо дослідженими. Особливо актуальним є вивчення того, чи змінює куркумін антигенні властивості ЛСА внаслідок конформаційних змін, що можуть призводити до активації імунної системи або імунологічних ускладнень при використанні таких комплексів у лікуванні.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження

У дослідженні були використані еукаріотичні клітинні лінії A431 (ATCC № CRL-1555) – клітини плоскоклітинної карциноми епідермісу людини, HEK293 (ATCC № CRL-1573) – трансформовані ембріональні клітини нирки людини, 8 мурчаків (*C. porcellus*). Клітини A431 та HEK293 були отримані з колекції клітин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, мурчаки утримувалися у віварії цього ж інституту.

2.2. Електрофорез у поліакриламідному гелі

Зразки для електрофорезу готували за співвідношенням PBS (рН 7.4) до буфера для проб як 9,8:1 із додаванням цільового білка з кінцевою концентрацією 0,2 мг/мл. Чистоту цільового білка оцінювали за допомогою методу електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН-ПААГ). Молекули білків розділяли в 10% поліакриламідному гелі в Tricine-Tris буферній системі із застосуванням електрофоретичної системи Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Анодний буфер – 0,2М Tris (рН 8.9), катодний буфер - 0,1М Tris, 0,1М Tricine, 0,1% ДСН. Електрофорез проводили за 120 В, 400 А протягом 90 хв. Фарбування гелю здійснювали за допомогою Coomassie Brilliant Blue G-250 [46, 47]. Концентрацію протеїнових препаратів вимірювали денситометрично з використанням програми Fiji ImageJ.

2.3. Спектрофотометрія

Спектр поглинання досліджуваного комплексу визначали методом спектрофотометрії з використанням приладу Optizen-POP (Optizen, Республіка Корея). Вимірювання здійснювали відносно контрольного зразка – 0,9% водного розчину натрію хлориду із 2% етиловим спиртом. Робочий розчин куркуміну (5 мг/мл) був розчинений у 96% етанолі. Потрібна кількість куркуміну додавалася до отриманої кількості білка ЛСА у розчині 0,9% натрію хлориду для досягнення молярного співвідношення 1:2 – білок:куркумін. Робочий розчин куркуміну, розведений у 0,9% розчині натрію хлориду у 50 разів із концентрацією 0,0271 мМ, використовувався як контроль. Для контролю ЛСА використовували його 0,0147 мМ розчин у 0,9% розчині натрію хлориду та 2% етиловому спирті. Усі зразки, що підлягали аналізу, мали молярне співвідношення компонентів, розведене у 10 разів відносно тих, які описані вище.

Для побудови калібрувальної кривої використовували метод вимірювання оптичної густини розчину серії стандартних розчинів відомої концентрації куркуміну: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31 мкг/мл. Фіксована довжина хвилі, за якої вимірюють оптичну густину для кожного розведення 420 нм [48].

2.4. Флуоресценція утвореного комплексу куркуміну та людського сироваткового альбуміну

Для отримання спектрів флуоресценції ЛСА з куркуміном та самого куркуміну використовували ті самі зразки, що й для спектрофотометричного вимірювання. Як розчинник було застосовано 0,09% розчин натрію хлориду та 0,2% етиловий спирт.

Спектри збудження та випромінювання флуоресценції реєстрували за

різних хвиль збудження: 400, 430 та 460 нм за допомогою стаціонарного спектрофлуориметра QuantaMaster 40 Intensity Based Spectrofluorometer виробництва РТІ (HORIBA Scientific, Канада). Спектри оптичного поглинання були отримані на двопробеновому скануючому ультрафіолетовому спектрофотометрі Medical Analysis UV-1800APC [49].

Наступним кроком було досліджено спектри флуоресцентної емісії та збудження для ЛСА з куркуміном у водних розчинах при концентрації ЛСА 2×10^{-6} М та концентрації куркуміну 0, $0,25 \times 10^{-6}$, 1×10^{-6} М, 2×10^{-6} М, 3×10^{-6} М, 4×10^{-6} М, рН 5.5. Спектри емісії та збудження флуоресценції реєстрували при трьох різних температурах (293, 303 та 313 К) за довжин хвиль збудження $\lambda_{ex} = 275$ нм та емісії $\lambda_{em} = 348$ нм з використанням стаціонарного спектрофлуориметра QuantaMaster 40 Intensity Based Spectrofluorometer (РТІ, HORIBA Scientific, Канада).

Аналіз гасіння флуоресценції передбачає насамперед встановлення його динамічного або статичного характеру, що може бути здійснено на основі застосування рівняння Штерна–Фольмера.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2.1)$$

де F_0 і F – інтенсивності у максимумі смуги флуоресценції для розчину ЛСА-куркумін за відсутності та в присутності гасника (куркуміну) при різних концентраціях відповідно;

K_{SV} – константа гасіння Штерна-Фольмера в припущенні динамічного механізму гасіння;

τ_0 – час життя збудженого стану;

K_q – константа швидкості бімолекулярного гасіння в рамках динамічного наближення;

$[Q]$ – концентрація гасника (куркуміну).

Для аналізу параметрів зв'язування в умовах статичного гасіння флуоресценції використовували рівняння Хілла, яке описує взаємодію між білком і лігандом. Рівняння має вигляд:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (2.2)$$

де F_0 і F – інтенсивність флуоресценції білка за відсутності та в присутності ліганду, відповідно;

$[Q]$ – концентрація ліганду (куркуміну);

K_a – константа асоціації, яка характеризує афінність ліганду до білка;

n – коефіцієнт Хілла, що відображає кількість ефективних сайтів зв'язування або ступінь кооперативності взаємодії.

2.5. Культивування культур клітин та визначення цитотоксичності куркуміну за допомогою МТТ-тесту

Клітинні лінії A431 та HEK293 підтримували у культурі в середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), збагаченому 10% фетальною сироваткою телят (FBS), стрептоміцином у концентрації 100 мг/л, пеніциліном (10 000 ОД/л) та амфотерицином В (250 мкг/л). Клітини вирощували у чашках із спеціальним покриттям для культури клітин за температури 37°C в умовах вологої атмосфери, насиченої 5% CO₂.

Оцінка цитотоксичності куркуміну та його комплексів проводилася із застосуванням МТТ-тесту, заснованого на визначенні метаболічної активності клітин.

Для оцінки впливу куркуміну, контрольного білка ЛСА та їх комплексів на життєздатність клітин, використовували клітинні лінії A431 і HEK293. Клітини висівали у 96-лункові планшети в кількості 50 000 клітин/лунку.

Зразки вводили у вигляді розведень: білок ЛСА - 27, 18, 12, 8, 5,4 та 2,4 мкМ; куркумін, розчинений у 0,9% розчині натрію хлориду з додаванням 2% етанолу – 50, 33,3, 22,2, 14,8, 9,9 та 4,4 мкМ. Комплекс ЛСА з куркуміном вносили у тому ж молярному співвідношенні. Інкубація клітин зі зразками тривала 12 год при стандартних умовах культивування еукаріотичних клітин.

Після інкубації живильне середовище замінювали на нове, що містило МТТ-реагент (Sigma, США) у кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, згідно з інструкцією виробника. Після 4-годинної інкубації проводили заміну середовища на лізуючий буфер, до складу якого входили 10% додецилсульфату натрію (ДСН), 0,04 М НСІ у диметилсульфоксиді (ДМСО), що забезпечувало повне розчинення гранул формазану. Оптичну щільність визначали за допомогою мікропланшетного рідера μ Quant ELx800 (BioTek, США) при довжині хвилі 545 нм [50].

Оптимальним варіантом рівняння, яке описує експериментальні точки, виявилось трипараметричне рівняння сигмоїдальної дозозалежної кривої:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}, \quad (2.3)$$

де x – концентрація куркуміну або його комплексу, що викликає інгібування проліферації клітин;

y – відсоток життєздатних клітин при відповідній концентрації інгібітора (x);

\min – рівень життєздатності клітин за відсутності інгібуючого впливу;

\max – життєздатність клітин при дії максимальної концентрації інгібітора;

IC_{50} – концентрація інгібуючої сполуки, за якої життєздатність клітин зменшується на 50% відносно контролю.

Всі експерименти виконувалися в трикратному повторі. Розрахунок значень IC₅₀ здійснювали за допомогою онлайн-калькулятора Quest Graph™ IC50 Calculator." AAT Bioquest, Inc., 7 Jun. 2023, www.aatbio.com/tools/ic50-calculator.

2.6. Отримання комплексу куркуміну із ЛСА для імунізації мурчаків

Робочий розчин куркуміну (5 мг/мл) був підготовлений у 96% етанолі. Потрібна кількість куркуміну додавалася до отриманої кількості білка ЛСА у розчині 0,9% натрію хлориду для досягнення приблизного молярного співвідношення 1:2 – білок:куркумін. Робочий розчин куркуміну, розведений у 0,9% розчині натрію хлориду у 50 разів із концентрацією 0,271 мкМ, використовувався як контроль. Для контролю ЛСА використовували його 0,147 мкМ розчин у 0,9% розчині натрію хлориду та 2% етиловому спирті. Третій контроль складався тільки із 0,9% розчину натрію хлориду та 2% етилового спирту.

2.7. Імунізація мурчаків підготовленими зразками і забір сироваток

Імунізацію проводили відповідно до стандартної схеми, розробленої для *C. porcellus* (мурчаків) віком 2 роки. Для оцінки імуногенної реакції негайного типу (гіперчутливість I типу) за класифікацією Gell і Coombs [51], дослідні зразки вводили мурчакам у молярному співвідношенні, описаному в попередньому методі, у об'ємі 0,5 мл. Введення здійснювали підшкірно у верхній ділянці шиї, яка є оптимальною зоною для спостереження за локальною запальною реакцією. Тварини були розподілені на окремі експериментальні групи, кожна з яких отримувала різні зразки відповідно до експериментального плану (табл. 2.1).

Схема імунізації передбачала трикратне введення комплексу ЛСА з куркуміном у молярному співвідношенні 0,149 мМ:0,271 мМ, а також контрольних зразків – білка ЛСА, розчину куркуміну та суміші 0,9% натрію хлориду з 2% етанолом. Інтервали між ін'єкціями становили 20, 16 та 52 дні, відповідно.

Таблиця 2.1

Експериментальний план імунізації мурчаків

Вид	К-сть тварин	Розчин введення (розчинений у 0,9% NaCl)
<i>C. porcellus</i>	2	0,271 мМ куркумін + 2% EtOH
<i>C. porcellus</i>	2	0,147 мМ ЛСА + 2% EtOH
<i>C. porcellus</i>	2	p-н 0,9% NaCl + 2% EtOH
<i>C. porcellus</i>	2	0,271 мМ куркумін + 0,147 мМ ЛСА + 2% EtOH

Забір крові здійснювали на 101-й день після початку імунізації шляхом пункції хвостової вени. Об'єм відібраного зразка становив приблизно 0,5 мл. Отриману кров витримували 40 хв при кімнатній температурі для утворення згустку, після чого здійснювали центрифугування при $900 \times g$ 30 хв. Сироватку (надосадову фракцію) переносили в стерильні пробірки з індивідуальним маркуванням, що відповідало номеру конкретної тварини.

2.8. Визначення робочого рівня вторинних антитіл кроля

Рівень зв'язування вторинних антитіл оцінювали методом імуноферментного аналізу (ІФА) [52]. У лунки 96-лункового плоскодонного планшета вносили сироватки мурчака та сироватки кроля у розведенні

1:1000 фосфатно-сольовим буфером (PBS: 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄, рН 7.4 та інкубували протягом ночі при 4 °С для адсорбції.

Після інкубації планшет тричі промивали PBS для видалення незв'язаних антитіл. Неспецифічні сайти блокували 1% розчином знежиреного молока в PBS протягом 60 хв при 37 °С.

Далі в лунки вносили антивидовий кон'югат anti-rabbit Ab (Sigma-Aldrich, США) в PBS-Т у послідовних розведеннях від 1:200 до 1: 20000 та інкубували при 37°С впродовж 60 хв. Повторювали процедуру відмивки для видалення незв'язаних продуктів реакції та вносили в лунки по 0,1 мл 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 візуалізували за допомогою мультилункового спектрофотометра з вертикальним потоком світла (ASYS Expert 96, Австрія) при довжині хвилі 450 нм (референта – 630 нм).

2.9. Визначення рівня антитіл в сироватці крові імунізованих мурчаків у системі ELISA

Рівень специфічних антитіл до антигенів зразків у сироватках імунізованих мурчаків визначали методом ELISA на 14-й день після останньої імунізації.

У першому варіанті експерименту було нанесено антиген – ЛСА з куркуміном в усі лунки планшета. У другому варіанті в лунки планшета наносили антигени ЛСА, куркумін, комплекс ЛСА з куркуміном, овальбумін (ОВА) та комплекс ОВА з куркуміном у трьох паралелях з кінцевою концентрацією ЛСА 5 мкг/мл, у фосфатно-сольовому буфері (PBS – (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄, рН 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 хв.

У першому варіанті зразки досліджуваної сироватки крові мурчаків, імунізованих фізіологічним розчином та комплексом ЛСА з куркуміном, розводили в початковому співвідношенні 1:50 до 1:3200 в PBS-T (PBS з Tween-20 в кінцевій концентрації 0,04%) та наносили на комплекс ЛСА-куркумін. У другому варіанті наносили сироватки мурчаків, які були імунізовані усіма 4 видами антигену у розведенні від 1:400 до 1:51200. У третьому варіанті вносили сироватки мурчаків, які були імунізовані усіма 4 видами антигену у розведенні від 1:400 у трьох повторях.

У всіх трьох експериментах інкубацію з первинними АТ проводили впродовж 1 години. Після цього планшет відмивали PBS-T для видалення неспецифічно зв'язаних АТ. Для виявлення первинних АТ в лунки планшету вносили антивидовий кон'югат anti-rabbit Ab (Sigma-Aldrich, США) в PBS-T у робочому розведенні 1: 500 та інкубували при 37°C впродовж 60 хв.

2.10. Статистичний аналіз

Статистичну обробку отриманих експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Для визначення достовірності відмінностей між показниками контрольних та експериментальних груп використовували t-критерій Стюдента. Величину розбіжностей вважали статистично значущою при рівні ймовірності $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз очищеного людського сироваткового альбуміну

Одним із способів підвищити біодоступність куркуміну в організмі є його введення у кров у формі комплексу з ЛСА [39]. Для того, щоб дослідити такий комплекс спочатку було перевірено чистоту самого білка. У дослідженні було використано ЛСА із концентрацією 3,01 мкМ/мл. Далі було проведено ДСН-ПААГ електрофорез. У результаті було встановлено високий ступінь чистоти білка, так як на гелі із різними введеними концентраціями наявно тільки по одному бенду у кожній з лунок на місці, яке відповідає молекулярній масі ЛСА – 66,5 кДа (рис. 3.1).

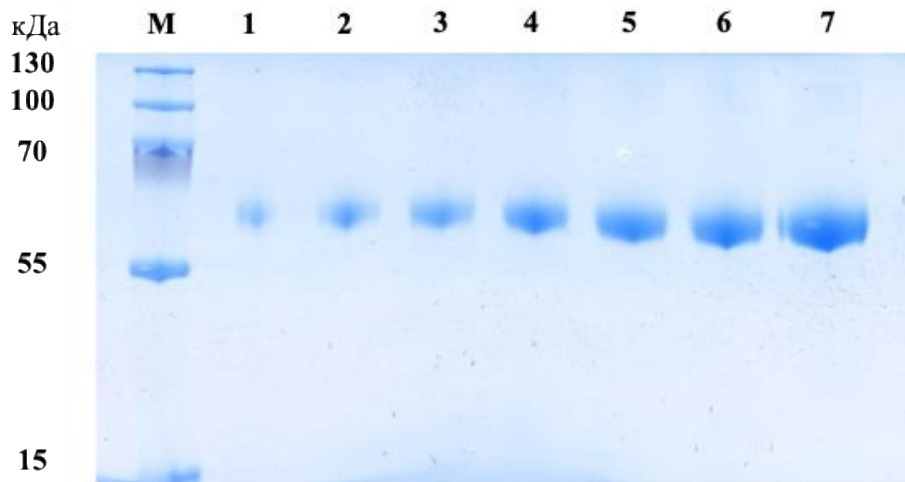


Рис. 3.1. ДСН-ПААГ електрофореграма ЛСА (66,5 кДа), гель забарвлений кумасі блакитним G-250. Концентрації ЛСА: 1 – 0,5 мкг/мл; 2 – 1 мкг/мл; 3 – 1,5 мкг/мл; 4 – 2 мкг/мл; 5 – 2,5 мкг/мл; 6 – 3 мкг/мл; 7 – 5 мкг/мл. М – маркер молекулярної маси, кДа

ЛСА – це мономерний, глобулярний білок, що складається з трьох

структурних доменів, кожен з яких складається із двох субдоменів (загалом 585 амінокислотних залишків): I домен – 1-195 залишки, II – 196-383, III – 384-585 (рис. 3.2) [51].

1	DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFA	50
51	KTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE	100
101	CFLQHKD DNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFY	150
151	APELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLKC	200
201	ASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDL	250
251	LECADDRADLAKYICENQDSISSK LKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPA	300
301	DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLA	350
351	KTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE PQNLIKQNC ELFQIGE	400
401	YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKV GSKCKKHPEAKRMPCAE	450
451	DYLSVVLNQ LCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVD ETVYVK	500
501	EFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD	550
551	FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL	585

Рис. 3.2. Аналіз амінокислотної послідовності ЛСА (PDB: 1AO6). Кольорами позначені різні домени білка: жовтим – I, блакитним – II, рожевим – III. Амінокислоти, які формують білкове оточення довкола молекули куркуміну, виділені чорним і підкреслені. Залишок Trp-214 (флуорофор ЛСА) виділений червоним кольором

Куркумін заходить саме у гідрофобну порожнину в субдомени II A (сайт I). У зв'язуванні куркуміну беруть участь різні амінокислотні залишки: Asp-106, His-146, Lys-190, Lys-432, Val-433, Lys-436, Gln-459, Ala-194, Arg-197 та Tyr-148 – полярні і неполярні, що свідчить про наявність не тільки гідрофобних взаємодій, а ще й іонних [43].

Аналіз молекулярної маси ЛСА (рис. 3.1), проведений на основі порівняння з амінокислотними послідовностями (рис. 3.2), підтвердив їх відповідність очікуваним значенням. Це свідчить про високу ступінь чистоти ЛСА, що дозволило використати його у дослідженнях як потенційний носій куркуміну.

3.2. Спектрофотометричний та флуоресцентний аналіз куркуміну та його комплексу з людським сироватковим альбуміном

У багатьох дослідженнях було уже показано, що куркумін має два стереоізомери. За рахунок цього він по різному абсорбує світло залежно від розчинника. Khandelwal [53] зазначає у своєму дослідженні, що флуорофорна природа куркуміну обумовлюється наявністю в його структурі кон'югованої системи подвійних зв'язків та карбонільних груп, що здатні до електронного збудження. Одним з основних типів переходів, який відповідає за поглинання світла у видимій області спектра, є π - π^* перехід. Цей перехід включає збудження електронів із π -зв'язуючих орбіталей до антизв'язуючих π^* -орбіталей у системі спряжених зв'язків. Оскільки такий перехід є низькоенергетичним, він відбувається при довжині хвилі близько 420 нм, особливо в органічних розчинниках, таких як етанол або метанол.

Окрім π - π^* , у спектрі поглинання куркуміну також фіксується n - π^* перехід. Цей тип збудження пов'язаний із перенесенням неспареного електрона з атома кисню (зокрема, у карбонільній групі) на антизв'язуючу π^* -орбіталь. Такий перехід є енергетично більш затратним, ніж π - π^* , і, відповідно, відбувається при меншій довжині хвилі – в ультрафіолетовій області. У розчині метанолу цей максимум поглинання спостерігається приблизно при 262 нм, що свідчить про активність n - π^* переходу в таких умовах [53].

Для спектрофотометричної оцінки куркуміну та його комплексу з ЛСА було використано куркумін із концентрацією 0,0271 мМ, ЛСА – 0,0149 мМ та їхній комплекс у такому ж молярному співвідношенні. Усі зразки містили 0,2% етанолу. Отримані максимуми поглинання куркуміну наближені до тих, які наведені вище у дослідженні Khandelwal [53]: перший максимум – 265 нм, другий – 402 нм, і ще одне майже непомітне плече на 369 нм (рис. 3.3).

Хоча присутність етанолу у воді знижує енергію необхідну для розчинення куркуміну, молекули води, які добре змішуються з етанолом,

легко утворюють з ним міцні Н-зв'язки, а, отже, це збільшує енергію, необхідну для π - π^* переходу, що призводить до синього зсуву, тому другий максимум поглинання спостерігається при 402 нм. Біля нього також присутнє невелике плече з довжиною хвилі 369 нм, яке далі за утворення комплексу повністю зникає. Звідси можна припустити, що куркумін заходить у гідрофобний сайт зв'язування білка і, таким чином, знижує своє значення оптичної густини при цій хвилі поглинання.

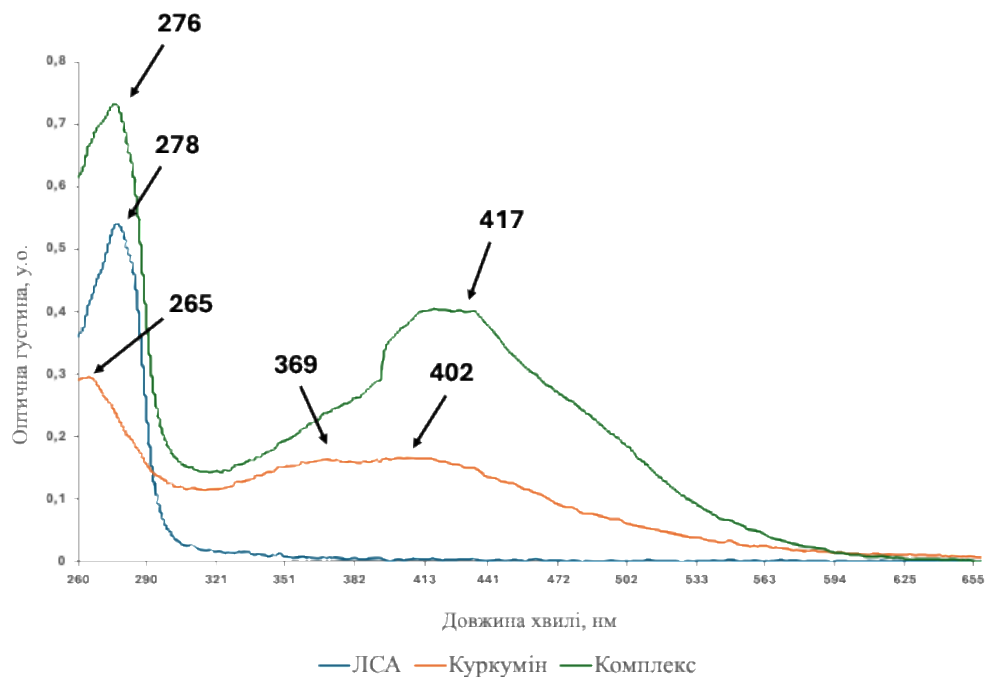


Рис. 3.3. Спектри поглинання ЛСА, куркуміну та його комплексу з ЛСА. Цифрами із стрілками позначені максимуми поглинання зразків. Усі розчини, що містять куркумін, готували в присутності 0,2% етанолу

Власна флуоресценція ЛСА походить майже виключно від залишку триптофану (Trp-214) у гідрофобній порожнині сайту I із отриманим максимумом для ЛСА – 278 нм.

Зі спектра поглинання зразків можна стверджувати, що у розчині дійсно формується комплекс куркуміну із ЛСА, адже отриманий спектр виявляє максимуми поглинання при 276 нм, що наближено спектру поглинання самим білком (рис. 3.3). Це відбувається за рахунок передачі енергії від ЛСА

(переважно залишку Trp-214) до акцептора – куркуміну, за механізмом FRET [42].

Також з'являється другий пік при 417 нм, який не характерний для ЛСА і розташований наближено до куркумінового другого піку із зсувом до інфрачервоної області. Отже, ЛСА підсилює як і розчинність куркуміну, так і його здатність абсорбувати світло більш, ніж у два рази.

Також було створено калібрувальну криву для куркуміну за 420 нм, при цьому значення $R^2 = 0,999$ показує дуже високу точність апроксимації (рис. 3.4).

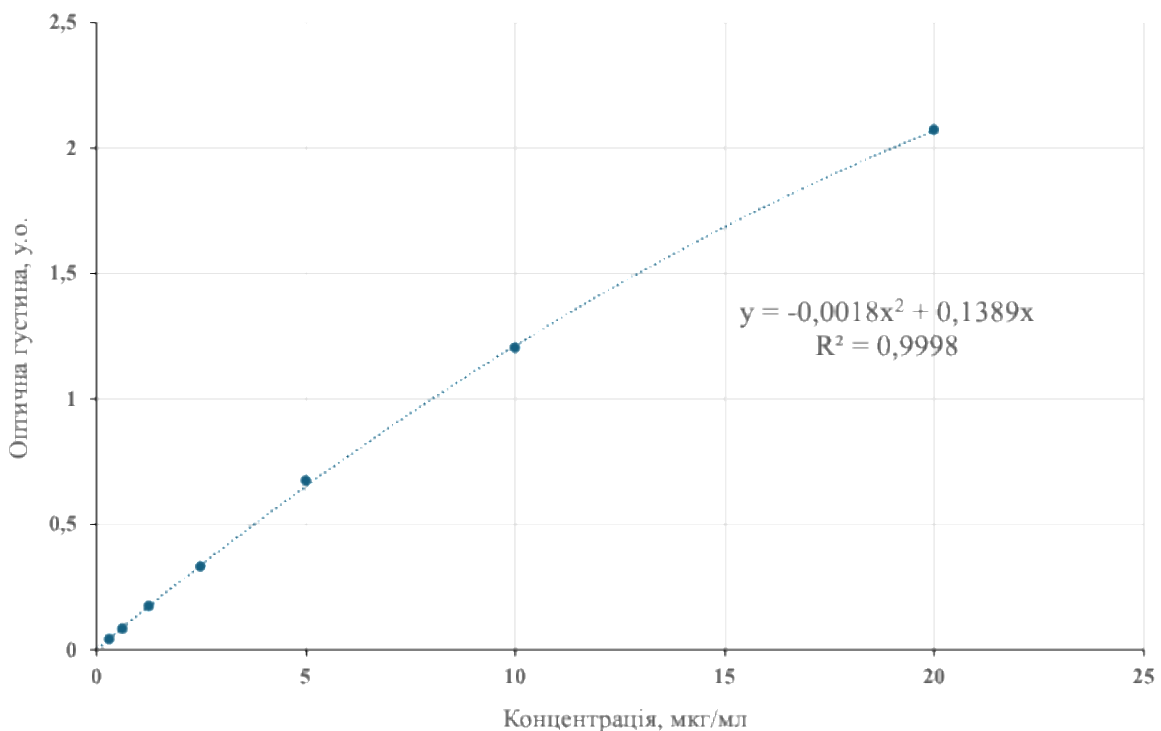


Рис. 3.4. Калібрувальна крива для куркуміну за 420 нм

Mondal [55] за допомогою методу флуоресценції у своєму дослідженні показав, що куркумін на своєму максимумі поглинання при температурі 303 К у середовищі етанолу за збудження у діапазоні 400-430 нм дав єдиний пік 526 нм. Для порівняння було також проведено оцінку флуоресценції куркуміну та його комплексу з ЛСА у 0,2% розчині етанолу при різних хвилях збудження: 400, 430 і 460 нм (рис. 3.5).

Для куркуміну найдовша хвиля емісії спостерігалася за збудження 430 нм і складала 519 нм. За збудження 400 нм – 538 нм, а за 460 нм – 530 нм. За утворення комплексу з ЛСА у молярному співвідношенні 2:1 при зміні хвиль збудження з 400 нм до 460 нм спостерігали зсув у бік інфрачервоного спектру, збільшення інтенсивності флуоресценції та емісію, залежну від збудження [55].

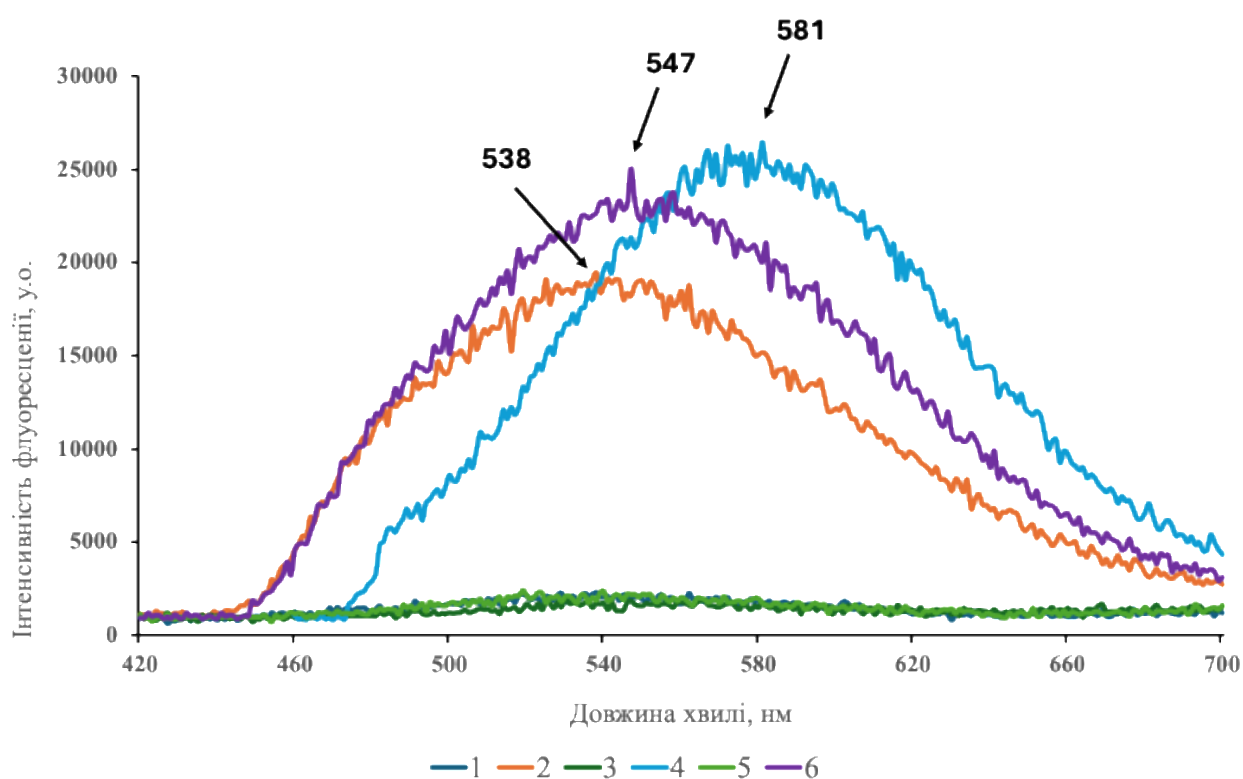


Рис. 3.5. Спектри емісії флуоресценції зразків за збудження хвилями різної довжини: 1 – куркуміну за $\lambda_{ex} = 400$ нм; 2 – куркуміну і ЛСА за $\lambda_{ex} = 400$ нм; 3 – куркуміну за $\lambda_{ex} = 460$ нм; 4 – куркуміну і ЛСА за $\lambda_{ex} = 460$ нм; 5 – куркуміну за $\lambda_{ex} = 430$ нм; 6 – куркуміну і ЛСА за $\lambda_{ex} = 430$ нм. Усі зразки готували в присутності 0,2% етанолу

Така кореляція може бути пояснена стереохімією куркуміну та впливом його приєднання на конформацію ЛСА. Графік показує, що найбільша інтенсивність флуоресценції комплексу відбувається за збудження 460 нм, при чому хвиля емісії складає 581 нм.

Наступним кроком було досліджено спектри флуоресцентної емісії та збудження для розчинів комплексу ЛСА із куркуміном у фізіологічному розчині при сталій концентрації ЛСА за відсутності та присутності куркуміну зі зростанням його концентрації (рис. 3.6). Із спектрів флуоресцентної емісії видно, що для всіх трьох температур збільшення вмісту молекул куркуміну в розчині призводить до гасіння флуоресценції. Водночас зі зростанням температури інтенсивність смуг у максимумах зменшується, зберігаючи їх положення поблизу 348 нм.

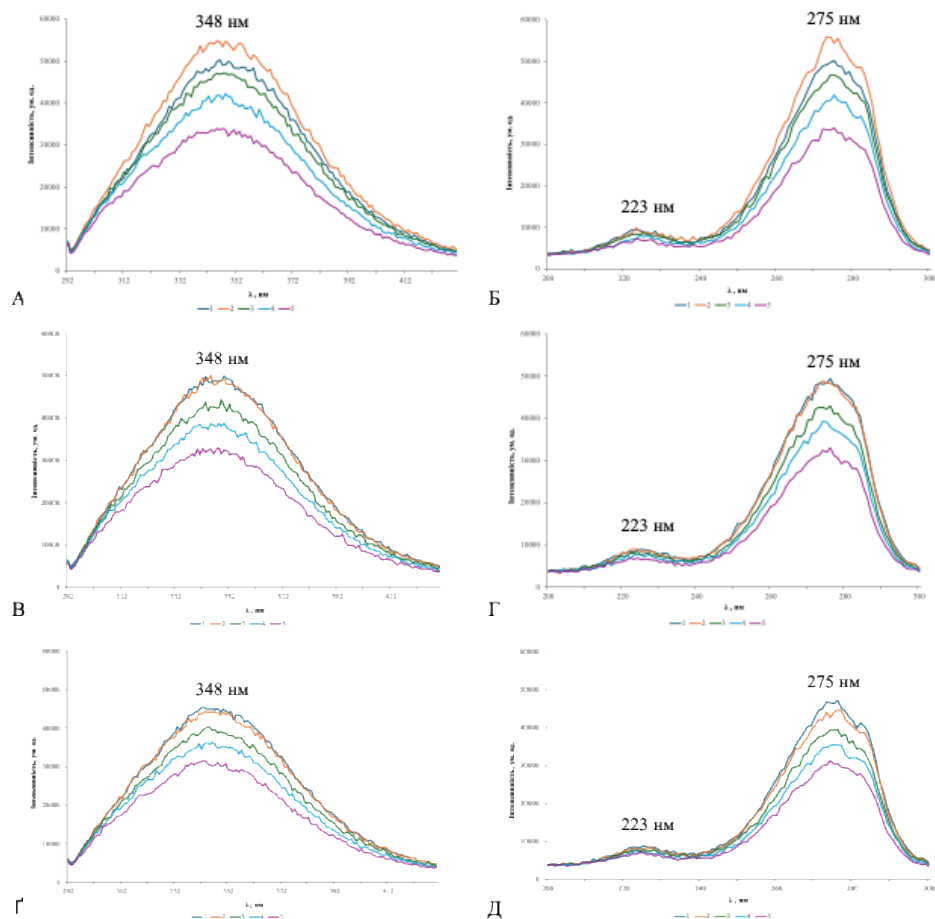


Рис. 3.6. Емісійні спектри флуоресценції (А, В, Г) та спектри збудження флуоресценції (Б, Г, Д) ЛСА з куркуміном у водних розчинах при концентрації ЛСА 2×10^{-6} М та концентрації куркуміну 0 (1), $0,25 \times 10^{-6}$ (2), 1×10^{-6} М (3), 2×10^{-6} М (4), 3×10^{-6} М (5), 4×10^{-6} М (6) М (Т = 293 (А, Б), 303 (В, Г), 313 К (Г, Д), рН 5.5, $\lambda_{\text{екст.}} = 275$ нм, $\lambda_{\text{ем.}} = 348$ нм)

Аналогічно спостерігається зменшення інтенсивності флуоресценції смуг збудження з максимумами поблизу 275 нм та 223 нм, що є характерними для ЛСА (рис. 3.6).

Аналіз гасіння флуоресценції передбачає встановлення його динамічної або статичної природи на основі застосування рівняння Штерна-Фольмера.

Holovko [44] у своєму дослідженні довів статичний механізм гасіння із зростанням температури та із зниженням стабільності комплексу білок-ліганд у водному розчині. При цьому константа біомолекулярного гасіння K_q перевищила дифузійну межу ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), що ще раз підтвердило статичну природу гасіння.

У нашому дослідженні було побудовано графіки залежностей Штерна-Фольмера для розчинів комплексу ЛСА з куркуміном (рис. 3.7).

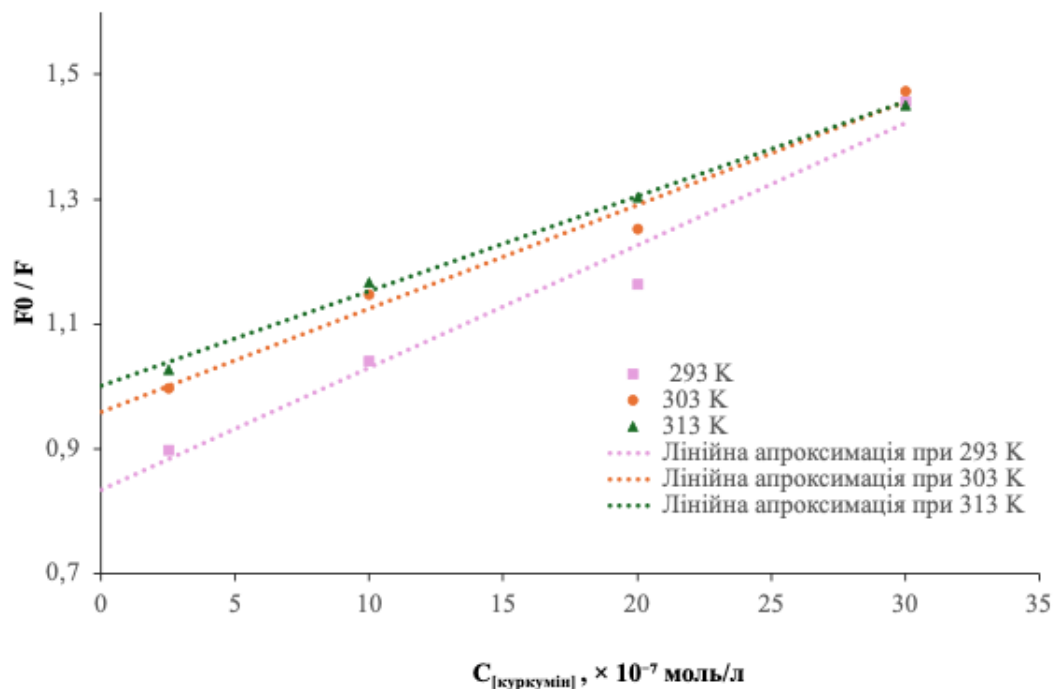


Рис. 3.7. Залежності Штерна-Фольмера для розчинів комплексу ЛСА з куркуміном у фізіологічному розчині при температурах 293, 303, 313 К. Лінії отримані шляхом апроксимації результатів лінійними залежностями Штерна-Фольмера

Також було розраховано константи Штерна-Фольмера K_{sv} та константи біомолекулярного гасіння K_q при різних температурах (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Константи гасіння та Штерна-Фольмера для системи ЛСА і куркуміну при різних температурах

Т (К)	Константа гасіння, $K_q, M^{-1} s^{-1}$	Константа Штерна- Фольмера, K_{sv}, M^{-1}
293	$1,95 \times 10^{13}$	$1,95 \times 10^5$
303	$1,65 \times 10^{13}$	$1,65 \times 10^5$
313	$1,52 \times 10^{13}$	$1,52 \times 10^5$

У результаті, так як і у вищенаведеному дослідженні, константа Штерна-Фольмера K_{sv} зменшувалась із зростанням температури, що свідчить про статичний механізм гасіння. При цьому значення константи біомолекулярного гасіння K_q також перевищила дифузійну межу з найвищим показником $1,95 \times 10^{13}$ при 293 К (табл. 3.1), що підтверджує статичний механізм гасіння.

Наступним кроком було оцінено та побудовано графіки залежностей Хілла для комплексу ЛСА з куркуміном у фізіологічному розчині при різних температурах (рис. 3.8). Із рівняння Хілла та лінійної апроксимації графіків були розраховані константи зв'язування K_a та коефіцієнти Хілла n (табл. 3.2).

Зменшення значення K_a зі зростанням температури відповідає екзотермічному характеру процесу зв'язування. Отримані значення констант зв'язування ($K_a \approx 10^2$ - $10^3 M^{-1}$) відповідають слабким, але специфічним взаємодіям між куркуміном та ЛСА (табл. 3.2).

У порівнянні із дослідженням Holovko [44], де коефіцієнт Хілла наближений до 1 ($n \approx 1$), що відповідає наявності одного сайту з'єднання у ЛСА з куркуміном, у нашому дослідженні $n \approx 0,4$ (табл. 3.2). Це свідчить про можливу гетерогенність центрів зв'язування, що може бути пов'язано з наявністю кількох сайтів зв'язування з різною афінністю до ліганду [56].

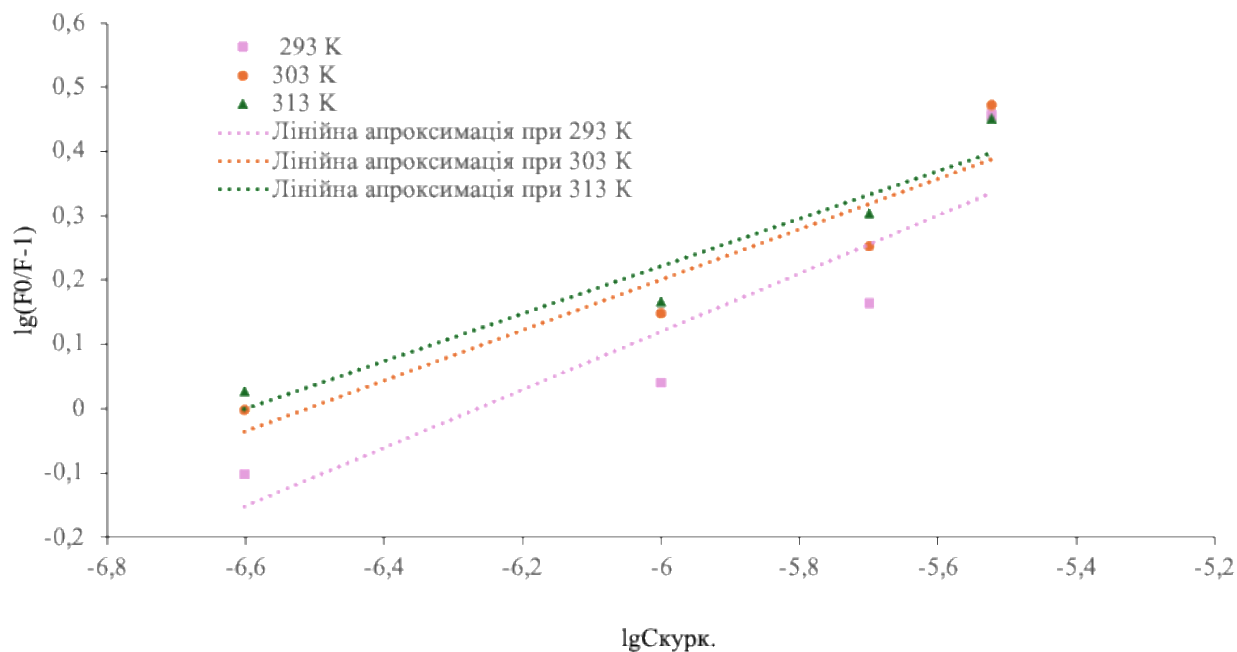


Рис. 3.8. Залежності Хілла для розчинів комплексу ЛСА з куркуміном у фізіологічному розчині при температурах 293, 303, 313 К. Лінії отримані шляхом апроксимації результатів лінійним рівнянням Хілла

Таблица 3.2

Константи зв'язування (K_a) та коефіцієнти Хілла (n) для системи ЛСА та куркуміну при різних температурах

T (K)	lgKa	n
293	2,83	0,452
303	2,56	0,394
313	2,44	0,369

Отримані результати за допомогою спектрофотометричного та флуоресцентного методів показали, що куркумін дійсно утворює комплекс із ЛСА. Такий комплекс дійсно має вищу інтенсивність абсорбції порівняно із куркуміном, а довжина хвилі піку його емісії прямо залежна від хвилі збудження. При утворенні комплексу ЛСА з куркуміном спостерігається гасіння флуоресценції зі зростанням концентрації куркуміну при збільшенні температури. Значення констант Штерна-Фольмера свідчать про статичний механізм гасіння при утворенні комплексу, а коефіцієнти Хілла ($n \approx 0,37; 0,4; 0,45$) вказують на гетерогенність сайтів зв'язування ЛСА з куркуміном.

3.3. Вплив комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном на малігнізовані та немалігнізовані клітини

Вивчення впливу куркуміну *in vitro* на різні клітинні лінії дозволяє не лише оцінити його потенціал як антипухлинного засобу, але й поглибити розуміння механізмів регуляції життєздатності клітин, оксидативного стресу та активації апоптотичних каскадів. Було проведено аналіз впливу куркуміну та його комплексу з ЛСА на клітинну виживаність малігнізованої та немалігнізованої клітинних ліній, A431 та НЕК293, відповідно.

Клітинна лінія A431, отримана з епідермальної карциноми, є малігнізованою клітинною лінією людини з епітеліальною морфологією, яка зазвичай росте кластерами. Вона широко використовується в дослідженнях раку, токсичності та імуноонкології, слугуючи позитивним контролем для експресії EGFR завдяки високій щільності цих рецепторів [57].

Ще у 1994 році Korutla [58] у своєму дослідженні показав, що куркумін значно пригнічує тирозинкіназну активність EGFR у клітинній лінії A431. Короткочасна обробка куркуміном знижувала EGF-індуковане автофосфорилування рецептора до 90% залежно від дози та часу дії. Ці

ефекти виникали ще до істотного пригнічення проліферації, вказуючи на первинну дію куркуміну на сигнальні шляхи клітинного росту.

Karthikeyan [59] у своєму дослідженні показав, що наночастинки ЛСА, навантажені куркуміном, демонструють підвищену протипухлинну активність *in vivo* порівняно з вільним куркуміном на моделі пухлинного ксенотрансплантата на тваринах, не проявляючи при цьому ніякої токсичності.

Khafif [60] показав, що інгібуючий ефект куркуміну на життєздатність клітин A431 є дозозалежним. Згідно з даними дослідження, значення IC_{50} для куркуміну знаходилося у межах 15-22 мкМ для різних тестованих клітинних ліній. Це вказує на відносно високу чутливість клітин A431 до куркуміну та підтверджує його потенціал як протипухлинного агента.

Клітинна лінія HEK293 походить від клітин ембріональної нирки людини, немалігнізована і схильна до трансфекції. Клітини зберігають морфологію епітеліальних клітин і є адгезійними в культурі [61].

Zhang [61] встановлено, що значення IC_{50} склало 20,1 мкМ для клітинної лінії HEK293.

Ще досі не має жодного дослідження, у якому було б показано цитотоксичний вплив комплексу куркуміну з ЛСА на клітинні лінії. Проте Лі [62] у своєму дослідженні синтезував наносфери з бичачого сироваткового альбуміну та оцінював їхню здатність інкорпорувати рослинний екстракт з протираковою активністю. Протиракову активність оцінювали на нормальних клітинних лініях HEK 293, і при цьому виявили, що наносфери куркуміну з бичачим альбуміном не є суттєво токсичними по відношенню до нормальної клітинної лінії HEK 293.

Виходячи із вищеописаних даних, було припущено, що, по-перше, куркумін характеризується протипухлинною дією на малігнізовану клітинну лінію A431, при цьому не проявляючи цитотоксичності до клітинної лінії HEK293; по-друге, так як комплекс з ЛСА підвищує період напіврозпаду куркуміну та його біодоступність, то клітинна виживаність для контролю

куркуміну має бути вищою за таку для комплексу з ЛСА. Окремо також виділили контроль ЛСА. За допомогою МТТ-тесту було отримано значення екстинції для двох клітинних ліній при впливі на них попередньо підготовленими зразками: куркуміну у концентрації 4,39, 9,88, 14,81, 22,22, 33,33, 50; ЛСА у концентрації 2,37, 5,35, 8,01, 12,02, 27,05; та комплексу ЛСА із куркуміном у такому ж послідовному молярному співвідношенні (рис. 3.9). При цьому наявність дуже низького відсотку етанолу у зразках ніяк не впливала на ріст клітин.

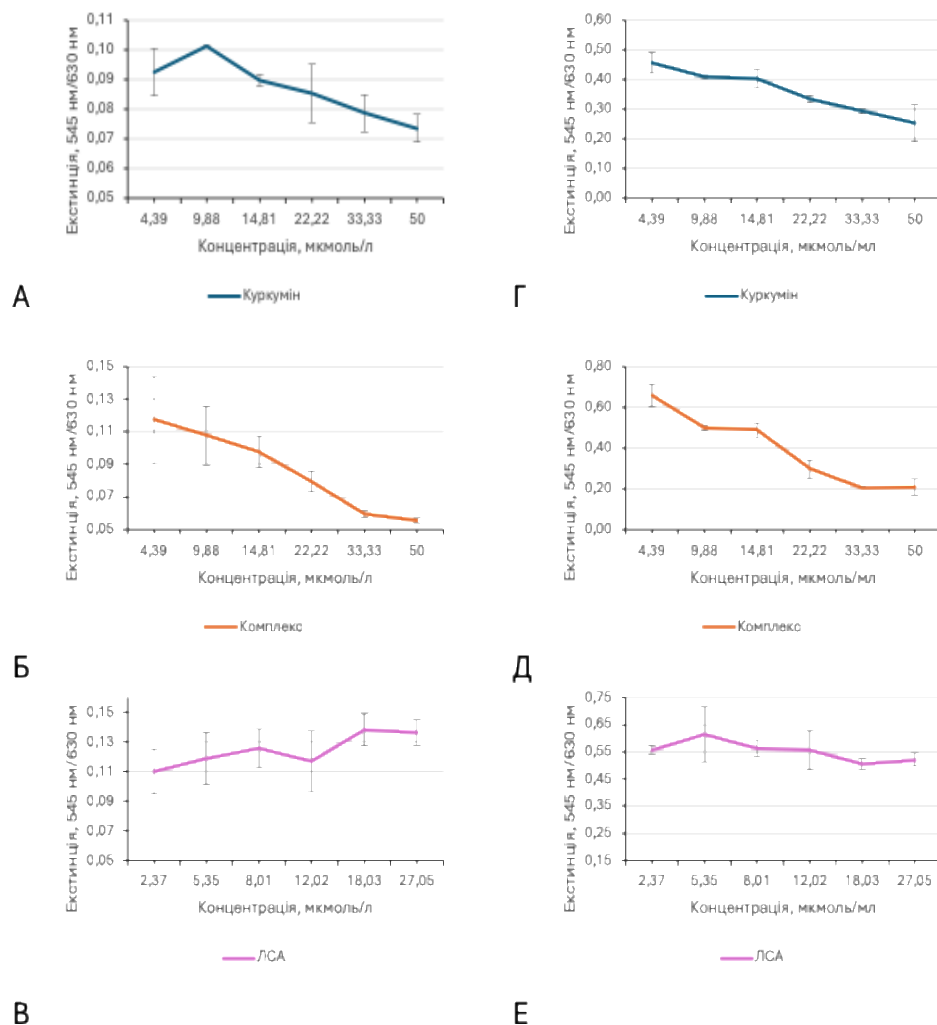


Рис. 3.9. Ступінь виживаності клітин А431 (А, Б, В) та НЕК293 (Г, Д, Е) щодо: А, Г – куркуміну; Б, Д – комплексу куркуміну із ЛСА; В, Е – ЛСА.
 $M \pm m$; $n = 3$

Для кращого розуміння впливу куркуміну та його комплексів на клітинні лінії *in vitro* була розрахована клітинна виживаність (%) (рис. 3.10).

У вищезазначених концентраціях куркуміну для клітинної лінії A431 було досягнуто ефекту цитотоксичності для 50% клітин, для НЕК293 – ні, (рис. 3.10, А, Б).

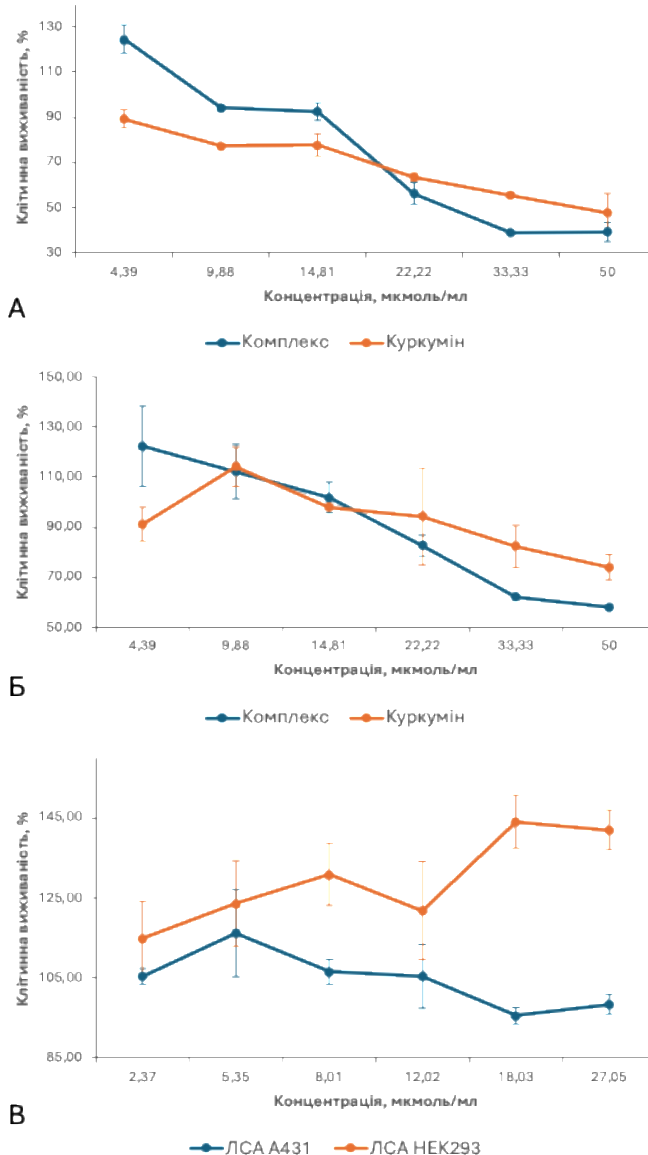


Рис. 3.10. Співвідношення клітинної виживаності щодо концентрації: А – куркуміну та комплексу (за куркуміном) для А431; Б – куркуміну та комплексу (за куркуміном) для НЕК293; В – ЛСА для А431 та НЕК293. $M \pm m; n=3$

При цьому внесення ЛСА до клітинної лінії A431 не показало суттєвих змін у клітинній виживаності, а до НЕК293 взагалі дало результати клітинної виживаності більше 100%, що вказує на проліферативний ефект самого білка на немалігнізовані клітини (рис. 3.10, В).

У контексті даного дослідження напівтоксичну дозу IC_{50} куркуміну та його комплексу з ЛСА визначали за допомогою МТТ-тесту. Для НЕК293 при максимально введений концентрації куркуміну 50 мкМ клітинна виживаність склала – 73,96%, для комплексу – 57,99% (рис. 3.10, Б). За таких показників не можна точно розрахувати IC_{50} для цієї клітинної лінії, адже не була досягнута 50% летальність культури клітин. Проте, з отриманих результатів можна припустити, що комплекс, все ж таки, має нижче значення IC_{50} в порівнянні із куркуміном, і це значення точно перевищує 50 мкМ.

Результати МТТ-тесту у дослідженні Ну [63] показали, що куркумін у концентрації 2,10 мкМ не впливав на життєздатність клітин після 24-годинної інкубації, однак, коли концентрація куркуміну досягала 20 мкМ, життєздатність клітин знижувалася. Такі ж результати були підтвердженні і у цьому дослідженні.

Проте було розраховано значення IC_{50} куркуміну та його комплексу з ЛСА для клітинної лінії A431 (рис. 3.11).

Якщо для куркуміну це значення склало 45,43 мкМ, то для комплексу – 18,02 мкМ. При цьому різниця між цими двома вибірками є статистично значущою ($p=0,018$).

На основі цих даних було зроблено висновок, що в комплексі з ЛСА куркумін дійсно стає більш доступним для клітин, в порівнянні із контрольним куркуміном, та проявляє цитотоксичні властивості щодо малігнізованої клітинної ліній карциноми A431.



Рис. 3.11. IC₅₀ для куркуміну та комплексу куркуміну із ЛСА для клітинної лінії A431. M±m; n=3. Статистичну значущість визначали за допомогою t-тесту: *- $p < 0,05$

У результаті проведених досліджень встановлено, що куркумін проявляє виражену цитотоксичну дію щодо малігнізованої клітинної лінії A431, тоді як щодо HEK293 такої дії виявлено не було в досліджуваному концентраційному діапазоні. Комплексування куркуміну з людським сироватковим альбуміном приводило до підвищення цитотоксичної активності куркуміну щодо A431, що проявлялося у зниженні значення IC₅₀ у порівнянні з вільним куркуміном (18,02 мкМ проти 45,43 мкМ, відповідно). Дані результати узгоджуються з літературними даними та підтверджують потенціал куркуміну та його комплексу з ЛСА як перспективних агентів протипухлинної терапії.

3.4. Визначення імуногенності комплексу куркуміну з людським сироватковим альбуміном у сироватках мурчаків

Кожен антиген характеризується широким діапазоном імуногенності, однак точне дозування антигену для імунізації є критично важливим. Невірно

підібрана кількість імунного препарату може спричинити розвиток імуносупресивного стану, формування толерантності або недостатню активацію клітинної ланки імунної відповіді. Оптимальне дозування залежить від фізико-хімічних властивостей самого антигену, обраного ад'юванту, а також шляху введення.

У рамках даного дослідження вивчалася імуногенність комплексу ЛСА з куркуміном. Було проведено чотирьохкратну імунізацію комплексу ЛСА з куркуміном у молярному співвідношенні 0,149 мМ : 0,271 мМ, а також контрольних зразків - білка ЛСА, розчину куркуміну та суміші 0,9% натрію хлориду з 2% етанолом для самців мурчаків у об'ємі 0,5 мл.

На наступний день після останньої імунізації був проведений скринінг на реакцію гіперчутливості негайного типу у мурчаків (рис. 3.12).

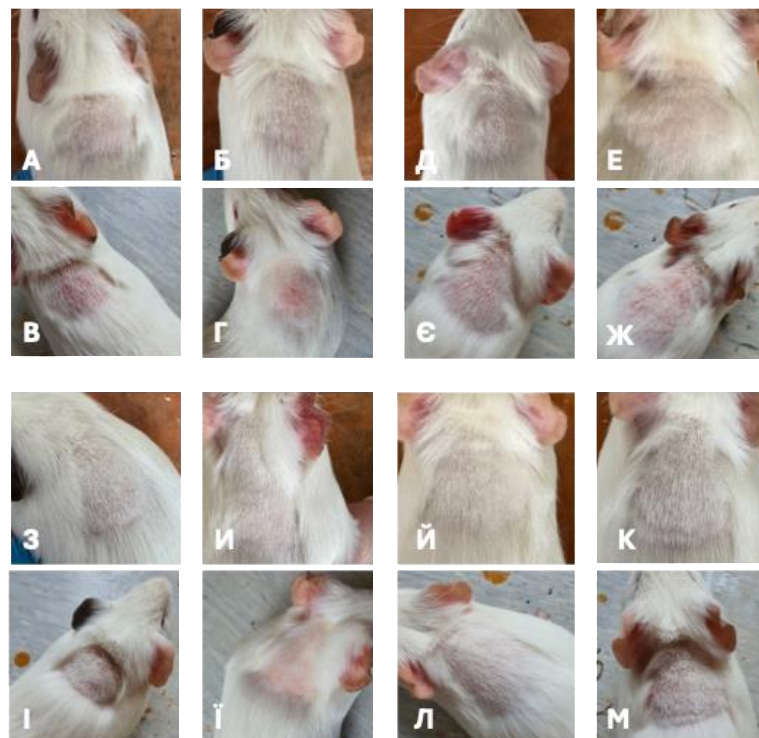


Рис. 3.12. Тест на алергічну реакцію першого типу у *C. Porcellus*, яким попередньо вводили ЛСА (А, Б), комплекс (Д, Е), куркумін (З, И), фізіологічний р-н (Й, К) і 1 день опісля останньої імунізації ЛСА (В, Г), комплексом (Є, Ж), куркуміном (І, Ї); фізіологічним р-ном (Л, М)

У тварин, які були імунізовані комплексом та чистим ЛСА, спостерігалось почервоніння шкіри. Гіперчутливість I типу - це реакція негайного типу, яка опосередковується IgE-антитілами, що взаємодіють з алергеном. Унаслідок цього відбувається розвиток типових симптомів - набряку, почервоніння та свербіжу впродовж 15–30 хвилин після контакту з антигеном [64]. Використання *C. porcellus* як біомоделі є доцільним, так як ці тварини мають високу чутливість до розвитку алергічних реакцій та добре репрезентують імунологічні процеси, пов'язані з гіперчутливістю I типу. Крім того, у мурчаків добре розвинена система шкірного кровопостачання, що дозволяє ефективно оцінити локальну реакцію після введення досліджуваних зразків.

Спочатку за допомогою методу ІФА було протестовано вторинні антитіла (кролячі) у послідовних розведеннях від 1:200 до 1:20000 на здатність виявляти IgG у первинній сироватці кроля і сироватці мурчака контрольної групи, який був імунізований фізіологічним розчином (рис. 3.13).

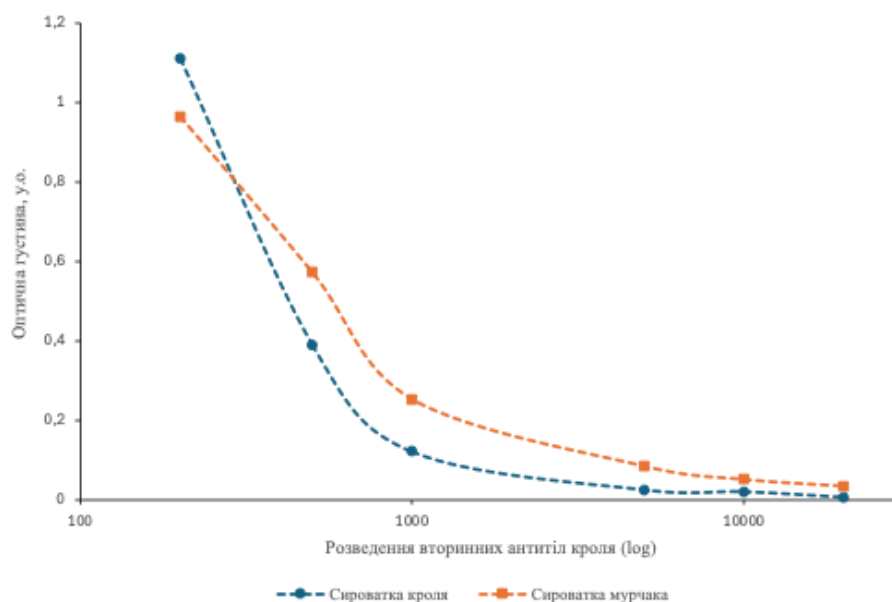


Рис. 3.13. Оптична густина залежно від розведення вторинних антитіл кроля (log) для сироватки кроля та імунізованого фізіологічним розчином мурчака

Результати показали, що вторинні антитіла ефективно зв'язуються як і з IgG кроля, так і з IgG мурчака, про що свідчить високий сигнал при менших розведеннях. Таке явище може бути спричинене перехресною реактивністю антитіл через структурну схожість Fc-фрагментів IgG різних видів. Для подальших експериментів було обрано розведення вторинних антитіл кроля 1:500.

Далі було порівняно наявність IgG антитіл до комплексу ЛСА з куркуміном у сироватках 2 мурчаків, імунізованих фізіологічним розчином та ще двох, імунізованих комплексом ЛСА з куркуміном (рис. 3.14). Сироватки мурчаків, що були імунізовані комплексом, демонструють значно вищі значення сигналу порівняно із тими, які були імунізовані фізіологічним розчином на всіх послідовних розведеннях (від 1:50 до 1:3200), що свідчить про наявність специфічної імунної відповіді.

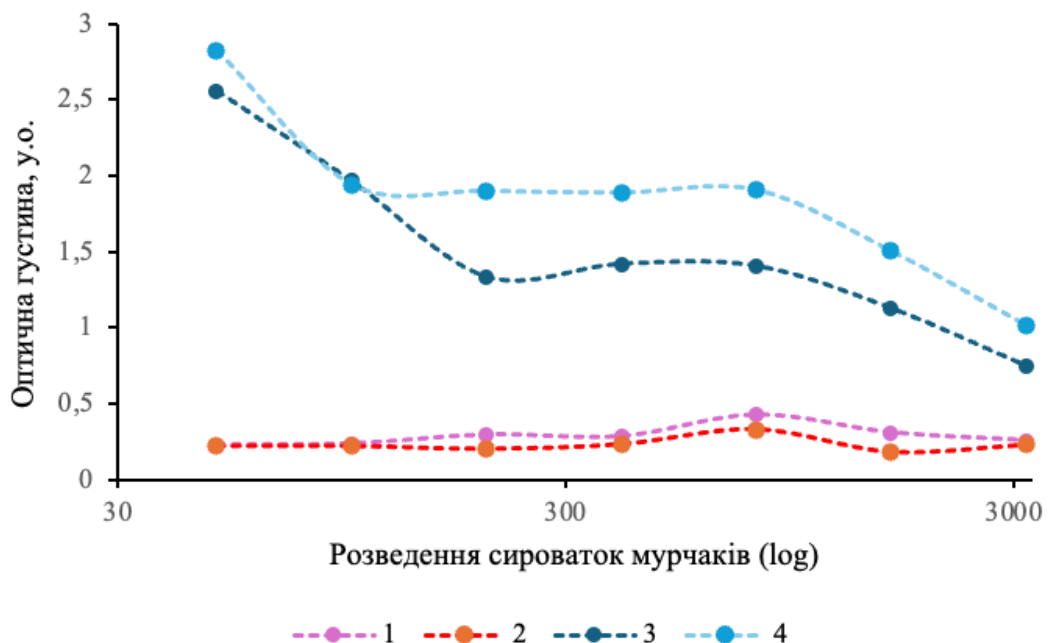


Рис. 3.14. Рівень IgG у сироватках мурчаків імунізованих фізіологічним розчином (1,2) та комплексом ЛСА-куркумін (3,4) у різних розведеннях

Далі було проведено аналіз сироваток мурчаків, імунізованих комплексом ЛСА-куркумін, чистим ЛСА та чистим куркуміном на двох

антигенах: ЛСА і комплексі, методом ELISA у серійних розведеннях (рис. 3.15). При цьому найвище значення сигналу на обох антигенах спостерігалось у сироватці мурчака, імунізованого комплексом, що свідчить про формування антитіл із високим титром. Сироватка тварини, імунізованої ЛСА, також демонструвала специфічну відповідь. Сироватка мурчака, імунізована куркуміном, дала низький рівень сигналу на всіх розведеннях.

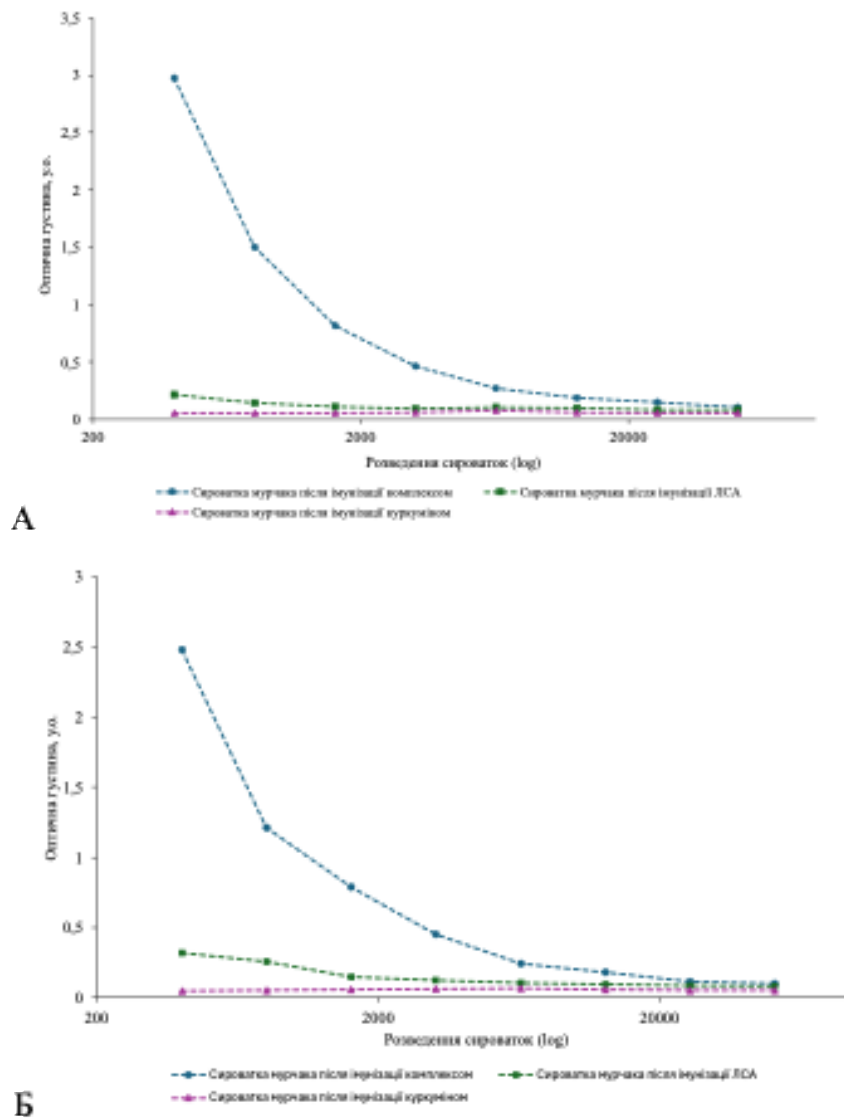


Рис. 3.15. Залежність оптичної густини від ступеня розведення сироваток мурчаків, імунізованих різними антигенами: А – ЛСА; Б – комплексом ЛСА-куркумін

У дослідженні Gefen [65] довів, що кон'югація гаптенів із БСА та ОВА та введення такого кон'югату мишам змінює спрямованість імунної відповіді, зменшуючи реакцію проти чистого білка та посилюючи продукцію антитіл до гаптену. Водночас у нашому дослідженні було отримано протилежні результати: комплексоутворення з куркуміном посилює імуногенність ЛСА, ймовірно за рахунок зміни антигенної структури молекули та формування нових епітопів.

Наступним кроком було перевірено наявність перехресної реактивності антитіл сироваток до ОВА. Було використано 4 типи антигенів: ЛСА, ЛСА з куркуміном, ОВА та ОВА з куркуміном. На цих антигенах було протестовано сироватки тварин, імунізованих чистим ЛСА, комплексом, чистим куркуміном та фізіологічним розчином у розведенні 1:400 (рис. 3.16).

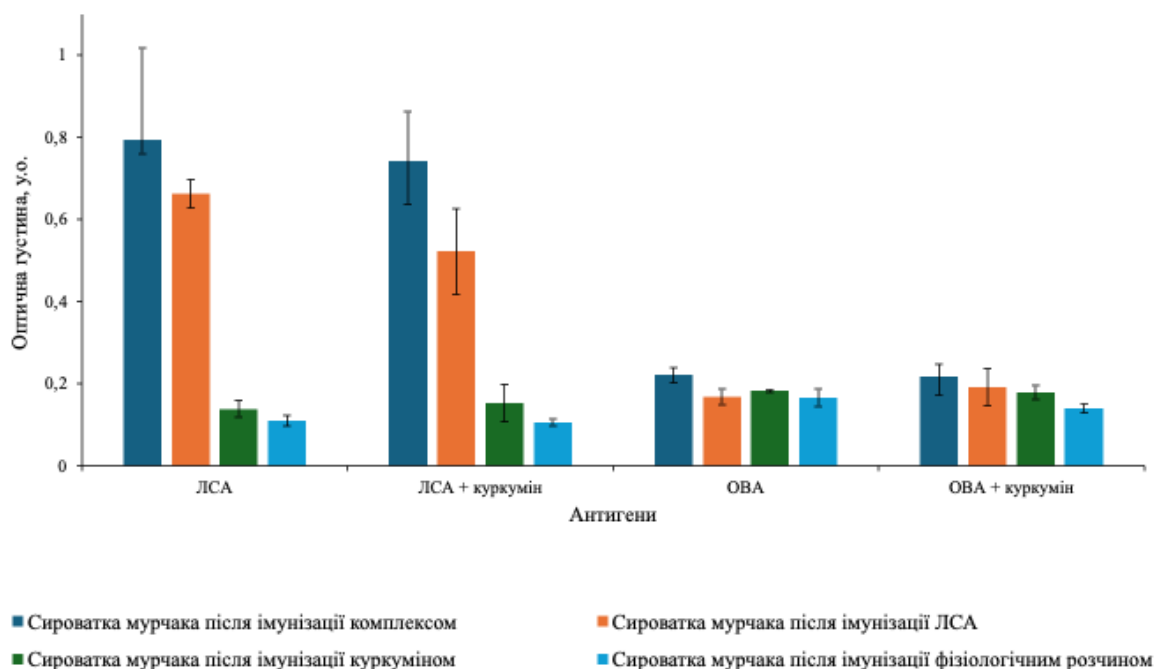


Рис. 3.16. Рівень специфічних антитіл у сироватках мурчаків, імунізованих різними антигенами (ЛСА, ЛСА-куркумін, ОВА, ОВА-куркумін), визначений методом ІФА. $M \pm m$; $n=3$

При використанні ОВА та комплексу ОВА-куркумін як антигенів, значних відмінностей між групами не виявлено, що свідчить про не

підвищення імуногенності куркуміну. Так як усі сироватки на антигенах ОВА та ОВА-куркумін дають сигнал на рівні контрольного, це говорить про відсутність перехресної реактивності антитіл.

У дослідженні Aravind [66] було проаналізовано ефективність та безпечність комплексу куркуміну з ЛСА у моделі асцитної форми лімфоми Дальтона у мишей. Було показано, що введення комплексу у дозах 11,4 мг/кг маси тіла не викликало токсичного ефекту, при цьому спостерігався виражений імуномодулюючий ефект: підвищення кількості лейкоцитів, тромбоцитів та стимуляція проліферації лімфоцитів. В *in vivo* експериментах показано значне зниження об'єму пухлини та збільшення тривалості життя тварин.

Загалом, отримані результати вказують на те, що комплексоутворення ЛСА з куркуміном не знижує імуногенність ЛСА, а може сприяти формуванню більш вираженої гуморальної імунної відповіді.

ВИСНОВКИ

Результати дослідження свідчать про здатність куркуміну утворювати стабільний комплекс із людським сироватковим альбуміном (ЛСА), що супроводжується посиленням його протипухлинної активності. При цьому виявлене комплексоутворення може сприяти формуванню більш вираженої гуморальної імунної відповіді.

1. Методом ДСН-ПААГ електрофорезу було підтверджено високий ступінь чистоти ЛСА, використаного в експерименті. Амінокислотний аналіз встановив наявність у структурі білка ключових залишків, зокрема в субдомени ПА (сайт I), які забезпечують зв'язування куркуміну у гідрофобній порожнині альбуміну.

2. Продемонстровано, за використання спектрофотометричних підходів, що комплекс куркуміну з ЛСА виявляє підвищену оптичну густину поглинання порівняно з вільним куркуміном, а також характерне гасіння піку за 369 нм. Розраховані константи Штерна-Фольмера свідчать про статичний механізм гасіння, а коефіцієнт Хілла вказує на гетерогенність сайтів зв'язування при взаємодії куркуміну з ЛСА.

3. Встановлено, що куркумін проявив цитотоксичну дію на ракову клітинну лінію A431, водночас комплекс із ЛСА продемонстрував ще вищу ефективність – значення IC_{50} знизилось у 2,5 рази. На клітини НЕК293 значного токсичного ефекту не виявлено.

4. Показано, що комплексоутворення куркуміну з ЛСА не знижує імуногенність білка і в окремих випадках може її посилювати. Водночас використання овальбуміну (ОВА) та комплексу ОВА-куркумін не виявило статистично значущих відмінностей між групами, а відсутність перехресної реактивності антитіл підтверджує специфічність імунної відповіді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nelson, K., Dahlin, J., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. and Walters, M. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of medicinal chemistry*, 60(5), pp. 1620–1637.
2. Unlu, A., Nayir, E., Dogukan Kalenderoglu, M., Kirca, O. and Ozdogan, M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(5), pp. 1050–1060.
3. Izadi, M., Sadri, N., Abdi, A., Zadeh, M., Jalaei, D., Ghazimoradi, M., Shouri, S. and Tahmasebi, S. (2024). Longevity and anti-aging effects of curcumin supplementation. *GeroScience*, 46(3), pp. 2933–2950.
4. Matloubi, Z. and Hassan, Z. (2020). HSA-curcumin nanoparticles: a promising substitution for Curcumin as a Cancer chemoprevention and therapy. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 28(1), pp. 209–219.
5. Kocaadam, B. and Şanlier, N. (2017). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(13), pp. 2889–2895.
6. Karłowicz-Bodalska, K., Han, S., Freier, J., Smolenski, M. and Bodalska, A. (2017). *Curcuma longa* as medicinal herb in the treatment of diabetic complications. *Acta poloniae pharmaceutica*, 74(2), pp. 605–610.
7. Nantasenamat, C., Simeon, S., Hafeez, A., Prachayasittikul, V., Worachartcheewan, A., Songtawee, N., Srungboonmee, K., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Prachayasittikul, S. and Prachayasittikul, V. (2014). Elucidating the structure-activity relationship of curcumin and its biological activities. In: D.L. Pouliquen, ed. *Curcumin: Synthesis, Emerging Role in Pain Management and Health Implications*. New York: Nova Science Publishers. Ch.2. pp. 49–86.
8. Vogel, H. and Pelletier, J. (1815). Curcumin-biological and medicinal properties. *J. Pharma*, 2(50), pp. 24–29.
9. Rajkumari, S. and Sanatombi, K. (2018). Nutritional value,

phytochemical composition, and biological activities of edible *Curcuma* species: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(3), pp. 2668–2687.

10. Suqing, S., Croutxé-Barghorn, C. and Xavier A. (2017). Photoinitiating systems for cationic photopolymerization: Ongoing push toward long wavelengths and low light intensities. *Progress in Polymer Science*, [online] Volume 65, pp. 141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.09.007> [Accessed 8 Feb. 2017].

11. Slika, L. and Patra, D. (2020). A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 17(1), pp. 61–75.

12. Chainoglou, E. and Hadjipavlou-Litina, D. (2020). Curcumin in Health and Diseases: Alzheimer's Disease and Curcumin Analogues, Derivatives, and Hybrids. *International journal of molecular sciences*, [online] Volume 21(6), pp. 1975. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21061975> [Accessed 30 Mar. 2020].

13. Peng, Y., Ao, M., Dong, B., Jiang, Y., Yu, L., Chen, Z., Hu, C. and Xu, R. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. *Drug design, development and therapy*, 15, pp. 4503–4525.

14. Kotha, R. and Luthria, D. (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*, [online] Volume 24(16), p. 2930. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24162930> [Accessed 13 Aug. 2019].

15. Shanmugam, M., Rane, G., Kanchi, M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M., Alharbi, S., Tan, B., Kumar, A. and Sethi, G. (2015). The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules*, [online] Volume 20(2), p. 1975. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules20022728> [Accessed 5 Feb. 2015].

16. Bharti, A., Shishodia, S., Reuben, J., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M. and Aggarwal, B. (2004). 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*, 103, pp. 3175–3184.

17. Lelli, D., Pedone, C. and Sahebkar, A. (2017). Curcumin and treatment of melanoma: The potential role of microRNAs. *Biomedicine and pharmacotherapy = Biomedecine and pharmacotherapie*, 88, pp. 832–834.

18. Anto, R., Mukhopadhyay, A., Denning, K. and Aggarwal, B. (2002). 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*, 23, pp. 143–150.

19. Giordano, A. and Tommonaro, G. (2019). Curcumin and Cancer. *Nutrients*, [online] Volume 11(10), p. 2376. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11102376> [Accessed 5 Oct. 2019].

20. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. and Khan, A. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, [online] Volume 50(1), p. 33. Available at: <https://doi.org/0.1186/s40659-017-0140-9> [Accessed 5 Oct. 2017].

21. Norouzi, S., Majeed, M., Pirro, M., Generali, D. and Sahebkar, A. (2018). Curcumin as an Adjunct Therapy and microRNA Modulator in Breast Cancer. *Current pharmaceutical design*, 24(2), pp. 171–177.

22. Wu, L., Guo, L., Liang, Y., Liu, X., Jiang, L. and Wang, L. (2015). Curcumin suppresses stem-like traits of lung cancer cells via inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncology reports*, 34(6), pp. 3311–3317.

23. Jin, H., Qiao, F., Wang, Y., Xu, Y. and Shang, Y. (2015). 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. *Oncology reports*, 34(5), pp. 2782–2789.

24. Lev-Ari, S., Starr, A., Vexler, A., Karaush, V., Loew, V., Greif, J., Fenig, E., Aderka, D. and Ben-Yosef, R. (2006). 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 research*, 26(6B), pp. 4423–4430.

25. Lee, K., Yang, H., Jeong, S. and Ma, J. (2012) Solid-phase extraction of curcuminoid from turmeric using physical process method. *Korean Journal of Pharmacology*, 43, pp. 250–256.

26. Elenitoba-Johnson, K. and Lim, M. (2018). New Insights into Lymphoma Pathogenesis. *Annual review of pathology*, 13, pp. 193–217.

27. Wu, C., Ruan, T., Liu, W., Zhu, X., Pan, J., Lu, W., Yan, C., Tao, K., Zhang, W. and Zhang, C. (2018). Effect and Mechanism of Curcumin on EZH2 - miR-101 Regulatory Feedback Loop in Multiple Myeloma. *Current pharmaceutical design*, 24(5), pp. 564–575.

28. Pandey, A., Vishnoi, K., Mahata, S., Tripathi, S., Misra, S., Misra, V., Mehrotra, R., Dwivedi, M. and Bharti, A. (2015). Berberine and Curcumin Target Survivin and STAT3 in Gastric Cancer Cells and Synergize Actions of Standard Chemotherapeutic 5-Fluorouracil. *Nutrition and cancer*, 67(8), pp. 1293–1304.

29. Kabir, M., Rahman, M., Akter, R., Behl, T., Kaushik, D., Mittal, V., Pandey, P., Akhtar, M., Saleem, A., Albadrani, G., Kamel, M., Khalifa, S., El-Seedi, H. and Abdel-Daim, M. (2021). Potential Role of Curcumin and Its Nanoformulations to Treat Various Types of Cancers. *Biomolecules*, [online] Volume 11(3), p. 392. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom11030392> [Accessed 7 Mar. 2021]

30. Cheng, M., Chou, F., Wang, K., Yang, R., Ding, J., Zhang, Q., Li, G., Yeh, S., Xu, D. and Chang, C. (2018). Androgen receptor (AR) degradation enhancer ASC-J9[®] in an FDA-approved formulated solution suppresses castration resistant prostate cancer cell growth. *Cancer letters*, 417, pp. 182–191.

31. Glaser, J. and Holzgrabe, U. (2016). Focus on PAINS: False friends in the quest for selective anti-protozoal lead structures from Nature. *MedChemComm*, 7, pp. 214–223.

32. Pan, M., Huang, T. and Lin, J. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism Disposition*,

27(4), pp. 486–494.

33. Yang, K., Lin, L., Tseng, T., Wang, S. and Tsai, T. (2007). 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.*, 853(1-2), pp.183–189.

34. Guo, Y., Wu, R., Gaspar, J., Sargsyan, D., Su, Z., Zhang, C., Gao, L., Cheng, D., Li, W., Wang, C., Yin, R., Fang, M., Verzi, M., Hart, R. and Kong, A. (2018). DNA methylome and transcriptome alterations and cancer prevention by curcumin in colitis-accelerated colon cancer in mice. *Carcinogenesis*, 39(5), pp. 669–680.

35. Hardwick, J., Taylor, J., Mehta, M., Satija, S., Paudel, K., Hansbro, P., Chellappan, D., Bebawy, M. and Dua, K. (2021). Targeting Cancer using Curcumin Encapsulated Vesicular Drug Delivery Systems. *Current pharmaceutical design*, 27(1), pp. 2–14.

36. Oskouie, M., Aghili Moghaddam, N., Butler, A., Zamani, P. and Sahebkar, A. (2019). Therapeutic use of curcumin-encapsulated and curcumin-primed exosomes. *Journal of cellular physiology*, 234(6), pp. 8182–8191.

37. Hassaniazad, M., Inchehsablagh, B., Kamali, H., Tousi, A., Eftekhari, E., Jaafari, M., Fathalipour, M., Nikoofal-Sahlabadi, S., Gouklani, H., Alizade, H. and Nikpoor, A. (2020). 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*, [online] Volume 21(1), p. 876. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04824> [Accessed 22 Oct. 2020].

38. Kumar, R., Zakharov, M., Khan, H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S. and Jasuja, R. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of amino acids*, [online] Volume 2011, p. 812540. Available at <https://doi.org/10.4061/2011/812540> [Accessed 26 Jul. 2011].

39. Tremmel, L., Rho, O., Slaga, T. and DiGiovanni, J. (2019). Inhibition of

Skin Tumor Promotion by TPA Using a Combination of Topically Applied Ursolic Acid and Curcumin. *Molecular Carcinogenesis*, 58(2), pp. 185–195.

40. Molaei, P., Mahaki, H., Manoochchri, H. and Tanzadehpanah, H. (2022). Binding Sites of Anticancer Drugs on Human Serum Albumin (HSA): A Review. *Protein and peptide letters*, 29(8), pp. 651–675.

41. Thadapakally, R., Aafreen, A., Aukunuru J., Habibuddin, M. and Jogala, S. (2016). Preparation and characterization of PEG-albumin-curcumin nanoparticles intended to treat breast cancer. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78, pp. 65–72.

42. Kim, B., Lee, C., Lee, E., Shin, B. and Youn, Y. (2016). Paclitaxel and curcumin co-bound albumin nanoparticles having antitumor potential to pancreatic cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, pp. 708–714.

43. Holovko, O., Dmytrenko, O., Lesiuk, A., Kulish, M., Pavlenko, O., Naumenko, A. and Veklich, T. (2023). Mechanisms of the interaction of bovine serum albumin with quercetin. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 768(2), pp. 29–43.

44. Holovko, O., Dmytrenko, O., Kulish, M., Lesiuk, A., Kaniuk, M., Naumenko, A. and Doroshenko, I. (2024). Human serum albumin and curcumin heteroassociate in aqueous solutions. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 768(14), pp. 638–652.

45. Liu, Y., Zhang, C., Pan, H., Li, L., Yu, Y. and Liu, B. (2021). An insight into the *in vivo* imaging potential of curcumin analogues as fluorescence probes. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 16(4), pp. 419–431.

46. Liu, B., Zhang, J., Hao, A., Xu, L., Wang, D., Ji, H., Sun, S., Chen, B. and Liu, B. (2016). The increased binding affinity of curcumin with human serum albumin in the presence of rutin and baicalin: A potential for drug delivery system. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 155, pp. 88–94.

47. Siromolot, A., Oliinyk, O., Kolibo, D. and Komisarenko, S. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* antigens MPT63 and MPT83 increase phagocytic

activity of murine peritoneal macrophages. *The Ukrainian Biochemistry Journal*, 88(5), pp. 62–70.

48. Schägger, H. and Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), pp. 368–379.

49. Aloï, E., Tone, C., Barberi, R., Ciuchi, F. and Bartucci, R. (2023). Effects of curcumin in the interaction with cardiolipin-containing lipid monolayers and bilayers. *Biophysical chemistry*, [online] Volume 301, p. 107082. Available at <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.107082> [Accessed 26 Oct. 2023].

50. Guo, Y., Yang, C., Zhang, Y. and Tao, T. (2022). Nanomaterials for fluorescent detection of curcumin. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, [online] Volume 265, p. 4081. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120359> [Accessed 15 Jan. 2022].

51. Abbas, M. and Goldin, J. (2025). Type I Hypersensitivity Reaction. In: StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

52. Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E. and Madiraju, C. (2023). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2612, pp. 1–17.

53. Khandelwal, P., Alam, A., Choksi, A., Chattopadhyay, S. and Poddar, P. (2018). Retention of Anticancer Activity of Curcumin after Conjugation with Fluorescent Gold Quantum Clusters: An *in Vitro* and *in Vivo* Xenograft Study. *ACS omega*, 3(5), pp. 4776–4785.

54. Mondal, S., Ghosh, S. and Moulik, S. (2016). Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 158, pp. 212–218.

55. Pale, V., Giedraityte, Z., Chen, X., Lopez-Acevedo, O., Tittonen, I. and Karppinen, M. (2017). Excitation-dependent fluorescence from atomic/molecular layer deposited sodium-uracil thin films. *Scientific reports*, [online] Volume 7(1), p. 6982. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24044081>

[Accessed 1 Aug. 2017].

56. Mammadova, A. J., Bakhishova, M. J., Gasymov, O. K., Celik, S., Akyuz, S. and Ozel, A. E. (2026). Mapping binding sites of human serum albumin and its nanoparticles: I. Hydrophobicity profile of binding sites. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, pp. 1–27.

57. Siromolot, A., Krynina, O., Kolybo, D. and Komisarenko, S. (2020). Antiproliferative and apoptotic effects of anti-human HB-EGF neutralizing polyclonal antibodies *in vitro*. *Experimental Oncology*, 42(1), pp. 25–30.

58. Korutla, L. and Kumar, R. (1994). Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1224(3), pp. 597–600.

59. Karthikeyan, A., Senthil, N. and Min, T. (2020). Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Frontiers in pharmacology*, [online] Volume 11, p. 487. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00487> [Accessed 1 May 2020].

60. Khafif, A., Lev-Ari, S., Vexler, A., Barnea, I., Starr, A., Karaush, V., Haif, S. and Ben-Yosef, R. (2009). Curcumin: a potential radio-enhancer in head and neck cancer. *The Laryngoscope*, 119(10), pp. 2019–2026.

61. Zhang, J., Yuan, H., Yao, X. and Chen, S. (2022). Endogenous ion channels expressed in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 474(7), pp. 665–680.

62. Li, Y., Revalde, J., Reid, G. and Paxton, J. (2011). Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(3), pp. 603–610.

63. Hu, C., Sheng, Y., Zhang, Q., Liu, H., Xie, X., Ma, W., Huo, R. and Dong, D. (2012). Curcumin inhibits hERG potassium channels *in vitro*. *Toxicology letters*, 208(2), pp. 192–196.

64. Feng, Y., Xu, L., Zhang, J., Bin, J., Pang, X., He, S. and Fang, L. (2024). Allergenic protein-induced type I hypersensitivity models: a review. *Frontiers in allergy*, [online] Volume 5, p. 1481011. Available at:

<https://doi.org/10.3389/falgy.2024.1481011>

65. Gefen, T., Vaya, J., Khatib, S., Rapoport, I., Lupo, M., Barnea, E., Admon, A., Heller, E., Aizenshtein, E. and Pitcovski, J. (2015). The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology*, 144(1), pp. 116–126.

66. Aravind, S. and Krishnan, L. (2016). Curcumin-albumin conjugates as an effective anti-cancer agent with immunomodulatory properties. *International immunopharmacology*, 34, pp. 78–85.