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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШУЛЬГА СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ

УДК 665.372:577.352.27 – 46

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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


С.М. Шульга

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

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

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

Представлена робота присвячена комплексному дослідженню молекулярних та структурно біологічних механізмів специфічної взаємодії флавоноїдів (куркуміну і його похідних) з амілоїдними та мікобактеріальними пептидами. Основна увага була зосереджена на встановленні ролі ліпосомальних форм активних фармацевтичних інгредієнтів (куркуміну і його похідних) як інгібіторів процесів запалення та моделювання молекулярних та стуктурно-біологічних механізмів специфічної взаємодії амілоїдних пептидів і їх роль в розвитку хвороби Альцгеймера.

Інфільтрація запальних цитокінів, оксидативний стрес та хронічні запалення пов’язані з виникненням та розвитком цілої низки захворювань. З цієї причини лікування препаратами з антиоксидантними та протизапальними властивостями може бути доцільним для попередження або уповільнення розвитку цих розладів. Поліфеноли, такі як флавоноїди, як відомо, є потужними антиоксидантами та протизапальними засобами. Таргетна доставка куркуміну може бути вагомою альтернативою класичним протоколам лікування. Для такої доставки потрібно мати відповідний засіб, оскільки у воді куркумін може утворювати агломерати. Можливою стратегією вдосконалення доставки куркуміну є завантаження у відповідні наноносії, які можуть покращити ефективність дії, локальне осадження та розподіл куркуміну. Такою системою доставки можуть слугувати ліпосоми – універсальні системи, до яких можна завантажувати як ліпофільні, так і гідрофільні

сполуки.

Метою роботи було створення ліпосомальної форми куркуміну для подальшого пошуку та з'ясування механізмів його протизапальної активності та застосування як нового лікарського засобу у випадку нейродегенеративних захворювань.

У роботі було використано комплекс різноманітних методів, зокрема, екстракцію рідинну фосфоліпідів ацетоном з фосфатидного концентрату олії соняшника, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) сухої суміші фосфоліпідів (лецитину) для визначення кількісного складу фосфоліпідів, фотометричне визначення розмірів ліпосом методом лазерного кореляційного розсіювання та методом атомно силової скануючої мікроскопії, жирнокислотного складу фосфоліпідів методом тандемної мас-спектроскопії, стабільності ліпосом методом електронного парамагнітного резонансу, біохімічні (спектрофотометричне визначення вмісту холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів і загального протеїну; імуноферментний аналіз концентрації для цитокінів IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10, $Aβ_{40}$, $Aβ_{42}$); фізіологічні (введення амілоїдних пептидів Аβ(1-40) і Аβ(1-42), моделювання хвороби Альцгеймера); математичні методи експериментальних досліджень (симуляція молекулярної динаміки амілоїдних пептидів та протеїновий докінг одержаних моделей з куркуміном); застосування підходів нанотехнологій, поведінкові тести на лабораторних тваринах і методи варіаційної статистики за кількісної обробки результатів (пакет Statistica 8.0). Усі експерименти проводили на лабораторних тваринах із дотриманням міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях», та статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447- IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятих в установах НАН України та НАМН України. Протоколи дослідів було погоджено Комісією з біоетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Комісією з біоетики ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України».

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

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

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

Список опублікованих праць за темою дисертації

Основні наукові результати дисертації, опубліковані у фахових виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports:

1. Sato R, Vohra S, Yamamoto S, Suzuki K, Karpov P, Blume Y, **Shulga S,** et. al. Specific interactions between tau protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular orbital simulations. J. Mol. Graphics Model. 2020; 98: 107611. https://doi.org/10.1016/j.jmgm. *(Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

2. Sogawa H, Tomioka S, Shinzato T, Karpov P, **Shulga S,** Blume Ya, et. al. Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: molecular docking and *ab initio* molecular orbital calculations. Chem. Physics. 2020; 530: 1-10. doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

3. Tomioka S, Sogawa H, Shinzato T, Ishimura H, Okamoto A, Blume Y, **Shulga S,** et. al. Effect of Zn ion on the structure and electronic states of Aβ nonamer: molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital calculations. Mol. Simulation. 2019; 45(9): 706-715, doi: 10.1080/08927022.2019.1579328. (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

4. Shinzato T, Sato R, Suzuki K, Tomioka S, Sogawa H, **Shulga S,** et. al. Proposal of therapeutic curcumin derivatives for Alzheimer's disease based on *ab initio* molecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2019; 738: 136883. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883. (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

5. Fujimori M, Sogawa H, Ota S, Karpov P, **Shulga S,** Blume Y, et. al. Specific interactions between mycobacterial FtsZ protein and curcumin derivatives: Molecular docking and ab initiomolecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2018; 692: 166-173 https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.12.045 (*Особисто дисертан- том запропоновано дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

6. Ishimura H, Tomioka S, Kadoya R, Shimamura K, Okamoto A, **Shulga S,** et. al. Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: *Ab initio* fragment molecular orbital calculations in water. Chem. Phys. Lett. 2017; 672: 13-20. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.041 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

7. Ota S, Fujimori M, Ishimura H, **Shulga S**, Kurita N. Proposal for novel curcumin derivatives as potent inhibitors against Alzheimer's disease: *Ab initio* molecular simulations on the specific interactions between amyloid-beta peptide and curcumin. Chem. Phys. Lett. 2017; 685: 482-489. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.08.024 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і*

обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті) **Q2**

8. Melnyk A, Sukhoveev O, Kononets L, Khilchevsky O, **Shulga S,** Kukhar V, et al. An EPR spin probe study of liposomes from sunflower and soybean phospholipids. J. Liposome Res. 2016; 26(1): 80-86, DOI: 10.3109/08982104 2015.1039031. (*Особисто дисертантом проведено частину експериментальнах досліджень, статистичний аналіз, формулювання висновків та написання статті*) **Q1**

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

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

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

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

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

підготовлено дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

результатів та написання статті).

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

14. **Шульга СМ.** Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво. Biotechnol. Acta. 2013; 6(5): 19-40. doi: 10.15407/biotech6.05.019

15. Хробатенко ОВ, Притульська НВ, **Шульга СМ.** Створення та дослідження ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. Biotechnol. Acta. 2013; 6(3): 110-115. (*Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел, обговорення результатів, формулювання висновків та написання статті*).

16. **Шульга СМ**, Глух ИС, Глух АИ, Дроздов АЛ, Школа ОИ. Разработка технологии получения сухого лецитина из фосфатидного концентрата подсолнечника. Наука та інновації. 2012; 8 (5): 62-71. (*Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті*).

17. **Шульга СМ,** Глух ІС, Дроздов ОЛ. Біологічні властивості лецитину соняшника. Наукові праці Одеської нац. академії харчових технологій. 2012; 42(1): 234-238. (*Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті*).

Монографії:

1. Дроздов ОЛ, Свіргун ІС, Сілкіна ЮВ, **Шульга СМ.** Нейротропний ефект лецитину. Дніпро: ЧМП «Економіка»; 2019. 172 с. (*Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділи 1 та 2.1.1 і 2.1.2*).

2. **Шульга СМ,** Микитюк ВВ, Глух І.С. Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва. Київ: Освіта України; 2010. 114 с. (*Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділи 3.1, 4 і 6*).

Патенти:

1. **Шульга СМ**, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, винахідники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, патентовласники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну. Патент на винахід №121627. 2020 Черв 25.

2. **Шульга С М**, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, винахідники: Шульга СМ, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ, патентовласники: Шульга С М, Глух ІС, Соколік ВВ, Дроздов ОЛ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну. Патент на корисну модель №134981. 2019 Черв 10.

3. Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, **Шульга СМ**, винахідники: Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, Шульга СМ, патентовласники: Соколік ВВ, Берченко ОГ, Левічева НО, Шульга СМ, Спосіб пригнічення нейрозапалення та корекції пам'яті при хворобі Альцгеймера в експерименті. Патент на корисну модель № 129295, 2018 Жовт 25.

4. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ**, Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90512. 2014 Трав 26.

5. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ**, Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90511. 2014 Трав 26.

6. Притульська НВ, Хробатенко ОВ, **Шульга СМ**, винахідники: Притульська НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ, патентовласники: Притульська НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ. Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування. Патент на корисну модель №77865. 2013 Лют 25.

7. **Шульга СМ,** Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, винахідники; Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, патентовласники: Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №54922. 2010 Лист 26.

Тези доповідей:

1. **Шульга СМ**, Глух ИС, Гаманухо ВИ, Школа ОИ, Терещенко СИ. Создание производства пищевой и биологически активной добавки «Лецитин» из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Сборник статей научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль биологически активных пищевых добавок в обеспечении здоровья населения»; 6-7 ноября 2003 г.; Днепропетровск; 2003; с. 96-97.

2. **Шульга СМ**, Глух ИС, Гаманухо ВИ, Школа ОИ, Терещенко СИ. Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин». В: Матеріали науково-практичної конференції «Харчові добавки, інгредієнти, БАДИ: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв»; 30.06 – 4.07. 2003 р., Феодосія, АР Крим, Київ: «Знання»; 2003; с.68-70.

3. **Sergiy M Shulga**, Igor S Glukh. Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions from sunflower. In: 10th ILPS phospholipid congress; 16-18 September 2011; Rotterdam, the Netherlands. https://orbit.dtu.dk

4. **Шульга СМ**, Глух ИС, Иващенко ТА. Получение L-α-лецитина и липосомальных наноэмульсий из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Тезисы докладов VI Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 21-25 марта 2011 г.; Москва; 2011; с. 435.

5. **Shulga S**, Glukh I. Liposomes and liposomal nanoememulsions from sunflower. In: 15th European Congress on Biotechnology; 23-26 September 2012; Istanbul, Turkey: «New biotechnology»; 2012; V. 29, Issue S, p. S127. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.08.355 **Q2**

6**. Shulga S**, Glukh I. Technology of Dry Powder Sunflower Lecithin for Food, Feed and Pharmaceuticals. In: 103rd AOCS Annual Conference & Expo; April 29-May 2, 2012; Long Beach, California, USA; 2012. file:///H|/Amie/abstracts/am2012/Phospholipid.htm

7**.** Shulga S, Glukh I, Drozdov O. Biological properties of deoil sunflower lecithin. In:

104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H|/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm

8. **Shulga S**, Glukh I, Danilov V. Multiscale molecular simulation and experimental investigation of sunflower phospholipids liposomes using for scavenging free radicals. In: 104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H|/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm

9. **Шульга СМ**, Глух ИС, Дроздов АЛ. Биологические свойства обезжиренного лецитина из подсолнечника. В: Тезисы докладов VII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 19 – 22 марта 2013; Москва; 2013; с. 73.

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

The presented work is devoted a complex study of molecular and structural biological mechanisms of specific flavonoids (curcumin and its derivatives) interaction with amyloid and mycobacterial peptides. The main focus was on establishing the role of active pharmaceutical ingredients (curcumin and its derivatives) liposomal forms as inhibitors of molecular and structural-biological mechanisms inflammation and modeling for specific amyloid peptides interactions and their role in the development of Alzheimer's disease.

Inflammatory cytokine infiltration, oxidative stress, and chronic inflammation are associated with the onset and development of a number diseases. For this reason, treatment of drugs with antioxidant and anti-inflammatory properties may be appropriate to prevent or slow the development of these disorders. Polyphenols such as flavonoids are known to be powerful antioxidants and anti-inflammatory drugs. Targeted delivery of curcumin can be an important alternative to classical treatment protocols. For such delivery it is necessary to have a suitable tool, because curcumin can form agglomerates in water. A possible strategy to improve curcumin delivery is loading into appropriate nanocarriers, which can improve the efficiency, local deposition and distribution of curcumin. Liposomes, universal systems to which both lipophilic and hydrophilic compounds can be loaded, can serve as such a delivery system.

The aim of the work was to create a liposomal curcumin form for further search and elucidation of its anti-inflammatory activity mechanisms and use as a new drug in the case of neurodegenerative diseases. A set of various methods was used in the work, in particular, extraction of liquid phospholipids with acetone from phosphatide concentrate

of sunflower oil, high performance liquid chromatography (HPLC) of a dry mixture of phospholipids (lecithin) to determine the quantitative composition of phospholipids, photometric method , fatty acid composition of phospholipids by tandem mass spectroscopy, stability of liposomes by electron paramagnetic resonance, biochemical (spectrophotometric determination of cholesterol, triglycerides, phospholipids and total protein; enzyme-linked immunosorbent assay concentration, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10, Aβ40, Aβ42); physiological (introduction of amyloid peptides Aβ (1-40) and Aβ (1-42), modeling of Alzheimer's disease); mathematical methods of experimental research (simulation of molecular dynamics of amyloid peptides and protein docking of the obtained models with curcumin); application of nanotechnology approaches, behavioral tests on laboratory animals and methods of variation statistics with quantitative processing of results (Statistica 8.0 package). All experiments were performed on laboratory animals in compliance with the international principles of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" and Article 26 of the Law of Ukraine "On Protection of Animals from Cruelty" (№3447-IV, 21.02.2006), as well as all norms of bioethics and biological safety adopted in the institutions of the NAS of Ukraine and the NAMS of Ukraine. The protocols of the experiments were approved by the Commission on Bioethics of the Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, the Commission on Bioethics of the Institute of Neurology, Psychiatry and Addiction of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Experimental data and computer simulation results have been obtained, which indicate a number of new aspects in the functioning of Aβ monomers and their complexes (dimers, trimers, hexa - and nonamers), which allow us to approach the understanding of Aβ aggregation mechanism in Alzheimer's disease. A new approach for overcoming inflammatory processes by nasal application of liposomal curcumin has been experimentally substantiated. For the first time method of obtaining mixture of sunflower oil phospholipids in the form of powder (defatted dry lecithin) was developed, and method of determining the qualitative and quantitative composition of phospholipids of the mixture by HPLC was developed, and the fatty acid composition of lecithin was

determined. The stability of liposomes from sunflower phospholipids was determined for the first time with the help of spin probes, and their significant stability under the conditions of initiated oxidation in comparison with liposomes from soybean and egg yolk phospholipids was shown. For the first time, liposomal adenosine triphosphate (ATP) form for oral administration and liposomal curcumin from sunflower phospholipids for nasal use were developed and the effectiveness of their inclusion was determined. For the first time it was shown that for solvated hexamer Aβ, which consists of trimers and water molecules, interactions between monomers of Aβ vapor pair make more significant contribution to the stability of hexamer than interaction of trimer monomers and found that charged amino acid residues such as Arg5, Asp7 , Glu22, Asp23 and Lys28 mainly promote interactions between monomer pairs and interactions of water molecules, which form networks of hydrogen bonds between charged residues and increase the stability of solvated hexamer Aβ. For the first time, a change in the structure of Aβ nonamer in water was shown, which explains reason for stability of Aβ-nonamer, and it was found that interactions between Aβ-peptides of compound pairs mainly contribute to the stability of Aβ-nonamer. Stability of solvated Aβ-nonamer depends on the water molecules associated with nonamer, and interaction between peptides composed of Aβ-pairs is stronger than between peptides of Aβ trimer. It has been established for the first time that curcumin can interfere with formation of Aβ-monomers by interacting with AβPP processing sites.

For the first time, liposomal nasal therapy with curcumin for rats with a preclinical model of Alzheimer's disease was found to inhibit angiotensin converting activity and showed greater anticytokine potential in the rat hippocampus, leading to the restoration of animal memory. It was first shown that addition of curcumin removed initiating effect of Aβ42 on the mononuclear pool of proinflammatory cytokines (IL-1β and TNFα), the toxic effect of Aβ42 inhibited the accumulation of IL-10 in mononuclear cells, but did not affect its secretion. The addition of curcumin restored the intracellular pool of this anti-inflammatory interleukin.

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ …… 20
ВСТУП…… 22
РОЗДІЛ 1. ОТРИМАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ СУХОЇ ЗНЕЖИРЕНОЇ СУМІШІ ЕСЕНЦІАЛЬНИХ ФОСФОЛІПІДІВ (ЛЕЦИТИНУ) ОЛІЇ СОНЯШНИКА……... 32
1.1 Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату……..... 34
1.2 Властивості і застосування сухого знежиреного лецитину……. 57
РОЗДІЛ 2. СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ ТРАНСПОРТНИХ НАНОСИСТЕМ (ЛІПОСОМ) З ФОСФОЛІПІДІВ ОЛІЇ СОНЯШНИКА.. 108
2.1 Методи отримання одношарових і багатошарових ліпосом…….. 110
2.2. Визначення стабільності ліпосом…… 132
РОЗДІЛ 3. СТВОРЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ……..... 158
3.1 Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми…… 160
3.2. Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми куркуміну……... 169
РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНІ ТА СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ СПЕЦИФІЧНОЇ ВЗАЄМОДІЇ АМІЛОЇДНИХ ПЕПТИДІВ……... 190
4.1 Специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних гексамерах……. 193
4.2 Конформаційні зміни β-амілоїдних мономерів в β-амілоїдних нонамерах…….. 201
4.3 Специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних фібрилах…… 207
4.4 Вплив іона Zn на структуру та електронні стани β-амілоїдних

наномерів…….. 213
4.5 Специфічні взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ ……..… 223
РОЗДІЛ 5. МЕХАНІЗМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ КУРКУМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ З АМІЛОЇДНИМИ ПЕПТИДАМИ У МОДЕЛЯХ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА ……..…… 233
5.1. Взаємодія куркуміну і його похідних з β-амілоїдним пептидом: молекулярне моделювання методом *ab initio*…… 237
5.2 Взаємодія похідних куркуміну з Tau протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio*…… 265
5.3 Взаємодія похідних куркуміну з FtsZ протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio* ……..…. 273
5.4 Взаємодія куркуміну з сайтами рестрикції АβРР…… 286
5.5 Вплив Аβ (42) на динаміку експресії та утворення Аβ (40), IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 у мононуклеарах і когнітивні характеристики щурів із моделлю хвороби Альцгеймера та його корекція куркуміном……..... 297
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ……. 249
ВИСНОВКИ……. 368
СПИСОК ДОДАТКОВО ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ …….. 371
ДОДАТОК ……..…… 373

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ІФА – імуноферментний метод аналізу;

куркумін I – куркумін (curcumin);

куркумін II – диметоксикуркумін (demethoxycurcumin);

куркумін III – бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin);

AICD – внутрішньоклітинний домен;

Aβ – β-амілоїдний пептид;

AβPP – попередник β-амілоїдного пептиду;

AD – хвороба Альцгеймера;

ATP – аденозинтрифосфат;

AFM – атомно-силова мікроскопія;

ChA – хлорагенова кислота, chlorogenic acid;

DMPC – димиристоїлгліцеро-фосфатидилхолін, dimyristoylglycero-phosphatidylcholine;

DPPC – дипальмитоїл-фосфатидилхолін, dipalmitoyl-phosphatidylcholine;

EGCG – (−)-*cis*-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate, (−)-*cis*-3,3′,4′,5,5′,7-Hexahydroxy-flavane-3-gallate,

EPR (ЕПР) – електронно-парамагнітний резонанс;

FtsZ – бактеріальний білок;

GDP – гуанозиндифосфат;

GTP – гуанозинтрифосфат;

LPC – лізофосфатидилхоліна;

MD – молекулярна динаміка;

MM – молекулярна механіка;

NMR (ЯМР) – ядерний магнітний резонанс;

PA – фосфатидна кислота, phosphatidic acid;

PC – фосфатидилхолін;

PE – фосфатидилетаноламін;

PG – фосфогліцерол;

PI – фосфатидилінозитол, phosphatidylinositol;

POPC – пальмитоїлолеїл-фосфатидилхолін, palmitoyloleoyl-phosphatidyl-choline;

POPE – пальмитоїлолеїл-фосфатидилетаноламін, palmitoyloleoyl-phosphatidyl-ethanolamine;

PS – фосфатидилсерин;

SDL – однакова щільність молекул фосфоліпідів у внутрішньому та зовнішньому шарах ліпосоми.

SFL – знежирений лецитин соняшника;

SNL – однакова кількість молекул фосфоліпідів, розташованих на внутрішньому і зовнішньому шарах мембрани ліпосом;

ssNMR – твердотільний ядерний магнітний резонанс;

TMD – трансмембраний домен;

Zantrin Z3 – (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine);

ZZ3 – (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine;

α ToC – α-токоферол, α-tocopherol.

ВСТУП

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

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

Відомо, що багато похідних рослинних метаболітів здатні безпосередньо впливати на медіатори запалення, а також на виробництво та активність вторинних месенджерів, факторів транскрипції та експресії прозапальних молекул, тим самим, пригнічуючи патологічні стани [1-3]. Поліфеноли, такі як флавоноїди, як відомо, є потужними антиоксидантами та протизапальними засобами, і серед усіх цих сполук було показано, що куркумін демонструє широкий спектр фармакологічної активності проти багатьох хронічних захворювань [4, 5]. Куркумін не тільки пригнічує проліферацію та метастазування пухлинних клітин, але й індукує їх апоптоз, впливаючи на вміст (активність) прозапальних цитокінів (інтерлейкін IL1, IL1b, IL12), фактор некрозу пухлини a (TNF-a) та інтерферону g (INF-g) [6]. Не зважаючи на потенційну активність, біодоступність куркуміну обмежена його низькою розчинністю у воді (0,6 мг/мл) та його деградацією, швидкому перетворенню in vivo в глюкороніди та сульфати.

Таргетна доставка куркуміну може бути вагомою альтернативою класичним

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

В ряді робіт [7-11] було проведено дослідження з завантаження кверцетину та куркуміну в везикули, що складались з фосфоліпідів і гліцерину (гліцеросоми). Отримані результати показали, що для поліпшення характеристик гліцеросом, завантажених кверцетином, потрібна велика кількість гліцерину і гідратація прямим додаванням водної дисперсії кверцетину або суміші гліцерин/вода для отримання гліцеросом. Дисперсія гліцеросом була дуже каламутною, як емульсія. Везикули були великими та полідисперсними, кверцетин осаджувався відразу після отримання препарату, а куркумін одразу випадав в осад в процесі приготування гліцеросом. Тому актуальним є завдання створення систем доставки активних фармацевтичних інгредієнтів, які виявляють погану розчинність у воді та низьку біодоступність, яка була б позбавлена цих недоліків. Така система доставки фармацевтично активних інгредієнтів як ліпосоми, утворені з рослинних або тваринних фосфоліпідів, практично повністю задовольняє цим вимогам.

Наразі, спостерігається поширення захворювань, які пов’язані зі зростанням тривалості життя населення та впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища. На жаль, досі медицина не має ефективних засобів лікування нейродегенеративної патології (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хвороба Гентінгтона). Більшість препаратів можуть лише трохи сповільнити перебіг хвороби, але не здатні зупинити руйнування синаптичних зв’язків і функціонування нейрональних мереж, які відповідають за когнітивні процеси і механізми пам’яті, що веде до слабоумства і смерті пацієнтів. [12]. У зв'язку з цим існує нагальна необхідність дослідження молекулярних механізмів ініціації, перебігу і регуляції амілоїдогенезу з метою розробки нових науково обґрунтованих підходів до його лікування з використанням новітніх досягнень біомедицини.

Підходи до терапії амілоїдозу і когнітивних порушень у випадку хвороби Альцгеймера, які зосереджені на пригніченні агрегації β-амілоїдного пептиду (Аβ) або на симптоматичній терапії, й дотепер не демонструють необхідної ефективності, тому актуальним є дослідження, спрямоване на вивчення назального застосування ліпосомальної форми куркуміну у випадку хронічного запалення, яке передує і супроводжує маніфестацію амілоїдозу.

Відомо, що попередник β-амілоїдного пептиду (АβРР) у нейронах виконує багато різноманітних функцій: як транспортер окремих сполук по аксону до пресинаптичної мембрани, в ході неамілоїдогенного процесінгу з нього утворюються сигнальні пептиди, за амілоїдогенного процесінгу – генерується β-амілоїдний пептид та сигнальні пептиди апоптозу [13]. Назальна терапія ліпосомальною формою куркуміну, може дати змогу дозовано пригнічувати надлишковий синтез АβРР і процесінг останнього за амілоїдогенним сценарієм.

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

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділу промислової та харчової біотехнології (пізніше - відділу геноміки та молекулярної біотехнології) Державної установи

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

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

Для досягнення поставленої мети до завдань роботи входило:

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

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

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

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

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

6. Дослідити взаємодію куркуміну з сайтами часткового розщеплення АβРР *in silico*.

7. Вивчити специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами та похідними

куркуміну і їх вплив (терапевтичний ефект) на розвиток хвороби Альцгеймера методом молекулярного моделювання.

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

Об'єкт дослідження – процеси виділення, ідентифікації та кількісного визначення фосфоліпідів олії соняшника та створенння ліпосом на їх основі; молекулярні та стуктурно-біологічні механізми специфічної взаємодії амілоїдних пептидів і куркуміна.

Предмет дослідження – характеристики ліпосомальної форми куркуміну; агрегація комплексів амілоїдних пептидів та амілоїдних пептидів з куркуміном і його похідними та їх роль в розвитку хвороби Альцгеймера; антизапальний ефект ліпосомальної форми куркуміну.

Методи дослідження включають фізико-хімічні, зокрема екстракцію рідинну фосфоліпідів ацетоном з фосфатидного концентрату олії соняшника, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) сухої суміші фосфоліпідів (лецитину) для визначення кількісного складу фосфоліпідів, фотометричне визначення розмірів ліпосом методом лазерного кореляційного розсіювання та методом атомносилової скануючої мікроскопії, жирнокислотного складу фосфоліпідів методом тандемної мас-спектроскопії, стабільності ліпосом методом електронного парамагнітного резонансу, біохімічні (спектрофотометричне визначення вмісту холестерину, тригліцеридів, фосфоліпідів і загального протеїну; імуноферментний аналіз концентрації для цитокінів IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10, $Aβ_{40}$, $Aβ_{42}$); фізіологічні (введення амілоїдних пептидів Аβ(1-40) і Аβ(1-42), моделювання хвороби Альцгеймера); математичні методи експериментальних досліджень (симуляція молекулярної динаміки амілоїдних пептидів та протеїновий докінг одержаних моделей з куркуміном); застосування підходів нанотехнологій, поведінкові тести на лабораторних тваринах і методи варіаційної статистики за

кількісної обробки результатів (пакет Statistica 8.0).

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

сайтами процесінгу АβРР. Вперше встановлено, що назальна терапія куркуміном у ліпосомальній формі для щурів з моделлю доклінічного етапу хвороби Альцгеймера обумовлює пригнічення ангіотензин перетворювальної активності та виявила більший антицитокіновий потенціал у гіпокампі щурів, що призвело до відновлення показників пам'яті тварин. Вперше показано, що додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект $Aβ_{42}$ на мононуклеарний пул прозапальних цитокінів (IL-1β і TNFα), токсична дія $Aβ_{42}$ пригнічувала накопичення IL-10 в мононуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії мономерів амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. З'ясовано молекулярний механізм такої взаємодії та запропоновано використання куркуміну в ліпосомальній формі для пригнічення виникаючих запалень. Вагомість роботи полягає найперше у формулюванні гіпотези щодо зв'язування куркуміну з фрагментом протеїну попередника β-амілоїдних пептидів (АβРР_63Rat), який вміщував всі три сайти ензимного процесінгу та втручання куркуміну у процес утворення Аβ-мономерів. Практичне значення дослідження полягає в розробленні нових біотехнологічних підходів для вивчення специфіки взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних гексамерах та фібрилах, оцінки конформаційних змін β-амілоїдних мономерів в β-амілоїдних нонамерах, впливу іонів Zn на структуру β-амілоїдних наномерів, взаємодії між β-амілоїдними пептидами та похідними куркуміну. Дослідження впливу похідних куркуміну на розвиток хвороби Альцгеймера методом молекулярного моделювання дозволило наблизитись до розуміння терапевтичного ефекту куркуміну. Терапевтичні ефекти, продемонстровані на експериментальних тваринах, відкривають нові можливості для розробки іноваційних методів у боротьбі з запальними процесами нейродегенеративних захворювань, а назальну терапію куркуміном можна рекомендувати для створення та впровадження в лікувальну практику доклінічної

стадії хвороби Альцгеймера антизапального спрея ліпосомальної форми куркуміну (Патент на корисну модель № 129295, 2018). Результати дослідження мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії мономерів амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера.

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

Особистий внесок здобувача. Автором проведено науковий пошук та критичний аналіз наявних даних літератури щодо обґрунтування ролі та вибраного таргетування ліпосомальної форми куркуміну у випадку хвороби Альцгеймера. В проведенні досліджень автором особисто виконано частину експериментальної роботи, аналіз отриманих результатів, їх наукову інтерпретацію та узагальнення, формулювання висновків та написання статей. Ряд експериментів було проведено разом зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками НВФ «Біолер»

к.т.н. І.С. Глухом, к.х.н. А.І. Глухом. Дослідження гепатопротекторної дії та нейротропного ефекту знежиреного лецитину соняшника проведено у співпраці з співробітниками НДІ медико-біологічних проблем Дніпропетровської медичної академії (директор, д.м.н., проф. О.Л. Дроздов). Аналізування стабільності ліпосом проведено у співпраці із співробітниками Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України к.х.н. А.Л. Мельником, к.х.н. О.В. Суховеєвим, к.б.н. Л.В. Кононець. Моделювання хвороби Альцгеймера та оцінку ступеня впливу ліпосомальної форми куркуміну у експериментальних тварин на про- та антизапальні інтерлейкіни проводили разом із к.б.н., с.н.с. В.В. Соколик і д.м.н., проф. О.Г. Берченко на базі лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України». Автор щиро вдячний керівнику Департамента компютерних наук і інженерії Технологічного Університету міста Тойохаші (Японія) проф. Норіюкі Куріта та його співробітникам за плідну співпрацю з молекулярного моделювання утворення і взаємодії мономерів Аβ в різних модельних системах, впливу іонів Zn і куркуміну в агрегатах та можливість використання комп'ютерних потужностей.

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

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідались на щорічних конференціях Американського Товариства Хіміків Жирів (103 AOCS, 2012, Лонг Бич; 105 AOCS, 2014, Сан Антоніо, США; 104 AOCS 2013, Монреаль, Канада); X міжнародному конгресі з фосфоліпідів (10th ILPS, 2011, Ротердам, Нідерланди); VI та VII Міжнародному конгресі «Біотехнологія: стан і перспективи розвитку» (2011, 2013, Москва. РФ); Міжнародних конференціях (2003, 2013, Дніпропетровськ, 2012, Одеса), Международній конференції «Химия, Био- и Нанотехнологии» (2013, Щолкіно, АР Крим), 15 Європейському конгресі з біотехнології (2012, Стамбул, Туреччина); 11 Конгресі Європейської федерації

ліпідів (2012, Стамбул, Туреччина); V Міжнародному симпозіумі MACC-5 (2013, Харків); XXIII Українській конференції з органічної хімії, присвяченої 95-річчю заснування НАН України (2013, Чернівці); XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів (2015, Львів); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики, комп'ютерного моделювання та обчислювальної техніки» (2016, Пенанг, Малайзія); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики: концепції, теорія та застосування (ICAICTA2017)» (2017, Кута, Індонезія), слухали та обговорювали на засіданнях відділу промислової та харчової біотехнології (пізніше відділу геноміки та молекулярної біотехнології) Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

Публікації. Результати дисертації викладено у 27 статтях, зокрема, у 10 статтях опублікованих у виданнях першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, 2 монографіях і 1 патенті на винахід та 6 патентах на корисну модель, а також в 17 тезах конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 381 сторінках, складається зі вступу, 5 розділів, висновків, списку додатково використаної літератури та додатка.

РОЗДІЛ 1
ОТРИМАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ СУХОЇ ЗНЕЖИРЕНОЇ СУМІШІ ЕСЕНЦІАЛЬНИХ ФОСФОЛІПІДІВ (ЛЕЦИТИНУ) ОЛІЇ СОНЯШНИКА

В розділі І представлено основні етапи створення технології знежиреної суміші фосфоліпідів олії соняшника у вигляді сипучого порошку (знежирений сухий лецитин), розроблену методику визначення якісного і кількісного складу фосфоліпідів суміші методом ВЕРХ, дослідження методом тандемної мас-спектрометрії складу жирних кислот фосфоліпідів та біологічні властивості знежиреного сухого лецитину соняшника. Розроблено універсальну технологію виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату олії соняшника будь-якої марки тристадійною обробкою фосфатидного концентрату ацетоном і фільтрацією після кожної стадії. Для кожної стадії екстракції знайдено співвідношення олія : ацетон, яке дозволяє максимально екстрагувати фосфоліпіди і в подальшому, в процесі сушіння, отримати лецитин у вигляді сипучого порошку. Для підвищення продуктивності кожний етап фільтрації проводили за допомогою центрифуг з факторами розділення 1) ≤100, 2) ≤150, 3) ≤200, впродовж 60-65, 40-45 і 30-35 хв, на першій, другій і третій стадіях, відповідно. Отриманий SFL мав масову частку вологи – 0.3%, масову частку олії – 0,7% і масову частку фосфоліпідів – 98,9%. Серед основних макрокомпонентів SFL визначено: фосфатидилхолін; фосфатидилетаноламін; фосфатидилінозитол (PI); їх лізоформи; фосфатидну кислоту, phosphatidic acid (PA); хлорагенову кислоту, chlorogenic acid (ChA); α-токоферол (α ToC). Для визначення і ідентифікації жирних кислот використовували метод тандемної мас-спектроскопії з електрохімічним розпиленням в позитивному (ідентифікація фосфатидилхолінів) та негативному (інших фосфоліпідів) режимах. Визначено, що основними насиченими жирними кислотами лецитину є пальмітинова кислота (16:0) і стеаринова кислота (18:0), а ненасиченою – лінолева кислота (18:2, омега-6). Пальмітинова та лінолева кислоти по-різному рекомбіновані в складі молекул фосфоліпідів соняшника. Лецитин з рослинної

сировини належить до природних харчових добавок (Е 322) і для нього відсутні обмеження на застосування в харчовій промисловості, а за своїми технологічними функціями – до емульгаторів і антиоксидантів. SFL, як емульгатор, у кількості 0,4% від маси борошна в тісті покращував органолептичні (збільшення пористості) та фізико-хімічні показники хлібобулочних виробів (збільшення об'ємного виходу, збереження вологи), створював стабільні маргаринові емульсії (у з'єднанні з емульгаторами, що використовуються у виробництві маргаринів) з кількістю жиру 82, 72, 60 і 50%, а також маргаринів для листкового тіста. При цьому кількість SFL, яка потрібна для створення стійкої емульсії, в два рази менше (0,05%), ніж за використання лецитину сої (SL) (0,125%), а для стабільних емульсій майонезу зменшення кількості жиру досягає 1,5–2 рази. SFL, за умов інтоксикації експериментальних тварин тетрахлорметаном, проявляв гепатопротекторну дію – сповільнював ріст маси печінки тварин, активність трансаміназ, стимулював регенерацію печінки за рахунок поліплоїдизації та гіпертрофії гепатоцитів, відновлював балкову і часточкову будову органа, підвищував кількість двоядерних гепатоцитів. Відмічено нейротропну дію SFL. SFL з рослинної сировини, який містить фосфоліпіди (кількісний склад яких можна змінювати, зокрема для РС від 30 до 98%) притаманні мембранам стінок клітин і який отримують в промислових масштабах, слугує відносно дешевою сировиною для виробництва ліпосом. Ліпосоми отримані з природних фосфоліпідів, в порівнянні з полімерними системами доставки, повністю біодеградують, біосумісні, їх введення не пов’язане з ризиком розвитку токсичних ефектів, імуногенності і алергічних реакцій. Крім того, однією з позитивних властивостей таких ліпосом, як транспортної системи, є фармакологічна активність самих природних фосфоліпідів.

1.1. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату олії соняшника

Наука та інновації. 2012. Т. 8. № 5. С. 62–71.

С.М. Шульга[1], А.И. Глух[1], И.С. Глух[2], А.Л. Дроздов[2], О.И. Школа[1]

[1] ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев
[2] НИИ медико-биологических проблем ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины», Днепропетровск

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЛЕЦИТИНА ИЗ ФОСФАТИДНОГО КОНЦЕНТРАТА ПОДСОЛНЕЧНИКА



Приведены результаты исследований сорбционно-структурных свойств сухого подсолнечного лецитина. На основе экспериментальных и теоретических исследований установлены оптимальные режимы работы аппаратов, которые используются в разработанной технологии получения лецитина.

Ключевые слова: лецитин, фосфатидный концентрат, экстракция, сушка.

Лецитины – сложные эфиры аминоспирта холина и диглицеридфосфорных кислот – являются важнейшими представителями фосфолипидов. По своей природе лецитины относятся к наиболее распространенной группе полярных липидов, из которых состоят клеточные мембраны всех живых организмов.

Лецитин – эффективный поверхностно активный агент. В присутствии двух несмешиваемых жидких фаз лецитин понижает поверхностное натяжение и действует как эмульгатор. Когда необходимо взаимодействие между твердой и жидкой фазой, лецитин действует как смачивающий и диспергирующий агент. При использовании между твердыми фазами вещество выступает как смазочный агент и агент освобождения (неприлипания к формам).

В промышленности лецитин получают из побочных продуктов производства растительных масел, таких, как соевое, подсолнечное, рапсовое, льняное, хлопковое, оливковое. Основными процессами получения лецитина, которые влияют на качество конечного продукта, являются экстракция ацетоном фосфатидного концентрата (система *жидкость – твердое тело*), фильтрация и сушка готового продукта.

Известна классификация дисперсных материалов [1], где на основе доминирующего показателя – критического радиуса пор (r_{max}) – материалы делятся на четыре группы в порядке уменьшения r_{max}. Деление групп на подгруппы осуществляется в соответствии с адгезионно-когезионными свойствами материала и эквивалентными диаметрами. Место, занимаемое конкретным материалом в классификации, определяет необходимый тип установок для его получения.

Изменения содержания ацетона и кривых сорбции/десорбции лецитина определяли методом газохроматографического анализа равновесной паровой фазы (АРП) [2], который представляет собой косвенный метод определения летучих компонентов в жидких или твердых материалах путем газохроматографического анализа паровой фазы, находящейся в термодинамическом равновесии с анализируемой пробой в замкнутой системе [3].

С гранулами и пластинами больших размеров равновесие *газ – твердое тело* устанавливается на протяжении десятка часов [4], поэ-

© С.М. ШУЛЬГА, А.И. ГЛУХ, И.С. ГЛУХ, А.Л. ДРОЗДОВ, О.И. ШКОЛА, 2012

тому парофазный анализ твердых материалов в равновесных или близких к ним условиях может проводиться лишь для мелкодисперсных порошков и достаточно тонких пленок.

В наших исследованиях использовали газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором.

Условия хроматографирования:

Температура колонки, °С	145
Температура испарителя, °С	150
Расход газа-носителя, л/час	2
Расход водорода, л/час	2
Расход воздуха, л/час	20
Объем вводимой пробы, мл	0,25

Сущность метода заключается в нахождении зависимости содержания ацетона в твердой фазе от его концентрации в паровой.

Указанная зависимость получена следующим образом. В склянки вместимостью 125 см^3 помещали навески лецитина, термостатировали при температуре 50 ± 2 °С в течение 5 час, после чего герметично закрывали. В каждую склянку с помощью микрошприца вводили от 0,3 до 10 % ацетона по отношению к массе твердой фазы. Выдерживали в течение 5 час при температуре 50 ± ± 2 °С при периодическом встряхивании, после чего анализировали содержание ацетона в газовой фазе. Концентрацию ацетона в лецитине определяли как разность между количеством ацетона, введенного в пробу, и количеством ацетона, содержащегося в газовой фазе. Последнее определяли по калибровочному графику в зависимости от площади пика:

$$S = H B_{0,5} M, \qquad (1)$$

где H – высота пика, мм; $B_{0,5}$ – ширина пика на половинной высоте, мм; M – масштаб записи сигнала.

Для построения калибровочного графика зависимости площади пика от концентрации ацетона в газовой фазе в предварительно нагретые до температуры 50 ± 2 °С и герметично закрытые склянки вместимостью 0,5 л вводили от 5 до 300 мг ацетона и после термостатирования в течение двух часов анализировали. При этом для точности и воспроизводимости результатов тщательно термостатировали пробы, шприц, дозировочную петлю и коммуникации, через которые подавалась анализируемая проба.

Зависимость площади пика от концентрации ацетона в газовой фазе при температуре 50 ± 2 °С представлена в табл. 1, а экспериментальные данные по определению содержания ацетона в лецитине представлены в табл. 2.

По полученным зависимостям определены изотермы десорбции паров ацетона, представленные на рис. 1. На оси ординат нанесены значения равновесного влагосодержания сухого лецитина (u, %), а на оси абсцисс – соответствующие им значения $\varphi = P/P_0 = C_{тек}/C_{нас}$, где $C_{тек}$ и $C_{нас}$ – концентрации (соответственно текущая и насыщения) паров ацетона в потоке газа. Аналогично определены изотермы сорбции.

По полученным изотермам десорбции паров ацетона построены кривые (интегральные и дифференциальные) распределения объемов пор по радиусам. Построение кривых проведено по методике, представленной в работе [1]. Из уравнения Томсона–Кельвина (2) вычисляли радиусы пор, соответствующие каждому определенному значению относительного давления пара ρ/ρ_0 на экспериментально полученной изотерме десорбции:

$$r_{max} = \frac{2\sigma V_{мол} \cos\theta}{RT \ln\left(\frac{1}{\varphi}\right)}, \qquad (2)$$

где $V_{мол} = M/\rho_{ж}$ – молярный объем жидкости; θ – угол смачивания; σ – коэффициент поверхностного натяжения.

Таблица 1

Зависимость площади пика (S) от концентрации ацетона (C)

$C_{ацет}$, г/см^3	0,1	1	2	5	10	20	50	80	120
S, мм^2	2,4	24,1	48,2	116,9	230	482,1	1213,75	1927	2764

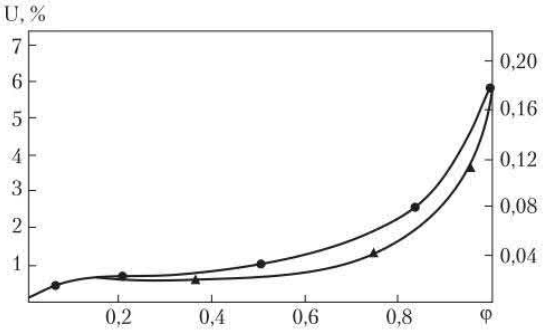


Рис. 1. Изотермы сорбции (▲) и десорбции (●) паров ацетона

Для тех же значений ρ/ρ_0 по изотерме десорбции находили величины сорбированного пара α, которые использовали для расчета объемов пор V, заполненных сорбированной жидкостью:

$$V = \alpha \cdot V_{мол}. \qquad (3)$$

На основании полученных данных строили интегральные $V = f(r)$ и дифференциальные $dV/dr = f(r)$ кривые распределения объемов пор по радиусам (рис. 2).

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о наличии ультрамикропор в частицах лецитина. Максимумы дифференциальных кривых указывают на преобладание пор диаметром 3–5 нм и 6–10 нм.

Согласно работе [1] адгезионно-когезионные свойства материалов характеризуются рангом адгезионно-когезионного коэффициента $K_{а-к}$, который определен как функция степени подвижности материала и угла внутреннего трения:

$$\frac{2}{K_{а-к}} = 1 + 2f^2 - 2f\sqrt{1+f}, \qquad (4)$$

где f – коэффициент внутреннего трения.

Коэффициент внутреннего трения вычисляли как

$$F = \operatorname{tg} \varphi_т, \qquad (5)$$

где $\varphi_т$ – угол внутреннего трения мелкодисперсного сыпучего материала, определенный по закону Кулона, который при наличии аутогезионного взаимодействия частиц в плоскости сдвига записывается следующим образом:

$$\tau = \operatorname{tg} \varphi_т (T + \sigma_н), \qquad (6)$$

где τ – сила сопротивления сдвигу; $\sigma_н$ – сжимающая нагрузка; T – прочность на разрыв.

Величину f определяли как тангенс угла наклона графической зависимости предельных касательных напряжений τ от давления σ в толще насыпного груза по результатам испытаний на трибометре. Величины σ и τ рассчитывали по формулам

$$\sigma = G/F, \qquad (7)$$

$$\tau = T - T_р/F, \qquad (8)$$

где G – суммарная масса прижимных пластин и материала в подвижной рамке трибометра; T – сила сдвига; $T_р$ – сопротивление подвижной рамки трибометра, F – площадь среза.

Таблица 2

Содержание ацетона в лецитине

Масса лецитина, г	Масса ацетона, мг	Площадь пика, мм^2	Концентрация ацетона, г/см^3	Количество ацетона в паровой фазе, мг	Содержание ацетона в лецитине	
					мг	%
0,5948	0,3945	48,2	2,0	0,250	0,1445	0,024
0,5333	0,7890	105,2	4,5	0,562	0,2270	0,043
0,7210	1,9720	253,0	11,0	1,375	0,5970	0,083
0,9227	3,9450	458,0	19,0	2,375	1,5700	0,170
0,8995	7,8900	971,0	40,0	5,000	2,8900	0,321
0,6729	15,7800	1951,0	81,0	10,125	5,6550	0,840
0,5948	31,5600	3144,0	136,5	17,060	14,5000	2,440
0,5333	47,3400	3761,0	163,5	20,420	26,9200	5,050
0,7210	63,1500	3836,0	166,5	20,830	42,3200	5,870

Для сухого лецитина значение f равно 1,41. После подстановки значения f в формулу (4) получим величину адгезионно-коэгизионного коэффициента $K_{а-к} = 3{,}34$.

Гранулометрический состав лецитина определяли методом микроскопического анализа [2] с помощью микроскопа «Biolar». Пределы увеличения (с бинокулярной насадкой – 15,5Х–2000Х; с монокулярной насадкой – 12,5Х–1600Х; чувствительность тонкого передвижения 1 мкм/1 деление) позволяли определять диаметр частицы до 0,2 мкм.

Полученные экспериментальные данные по гранулометрическому составу лецитина представлены на рис. 3 и в табл. 3.

Эквивалентный диаметр частиц лецитина рассчитывали как

$$d_{экв} = d_{3,2} = \frac{\Sigma \delta_i^3 \Delta n_i}{\Sigma \delta_i^2 \Delta n_i}, \qquad (9)$$

где $d_{3,2}$ – средний объемно-поверхностный диаметр полудисперсной смеси.

В результате расчета получили $d_{экв} = 432$ мкм.

Таким образом, полученные экспериментальные результаты свидетельствовали об ультрамикропористой структуре лецитина с эквивалентным диаметром частиц менее 1 мм и $K_{а-к} \geq 3$. На основании результатов исследований лецитин отнесен к первой подгруппе четвертой группы материалов. Поэтому для его производства требуются аппараты с активными гидродинамическими режимами. В первую очередь это касается аппаратурного оформления процессов экстракции фосфатидного концентрата ацетоном, фильтрации обезжиренных фосфатидов и сушки конечного продукта. С учетом сформулированных требований к оборудованию создана лабораторная установка, на которой отработаны технологические параметры производства сухого подсолнечного лецитина.

Для опытов использовали подсолнечный фосфатидный концентрат производства Запорожского МЖК со следующими характеристиками: массовая доля фосфатидов – 65,2 %; массовая доля масла – 32,8 %; массовая доля влаги

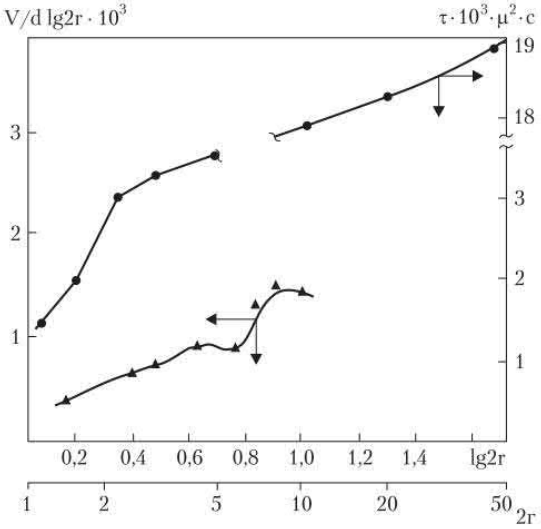


Рис. 2. Интегральные $V = f(\lg 2r)$ (●) и дифференциальные $dV/d\lg 2r = f(\lg 2r)$ (▲) десорбционно-структурные характеристики сухого лецитина

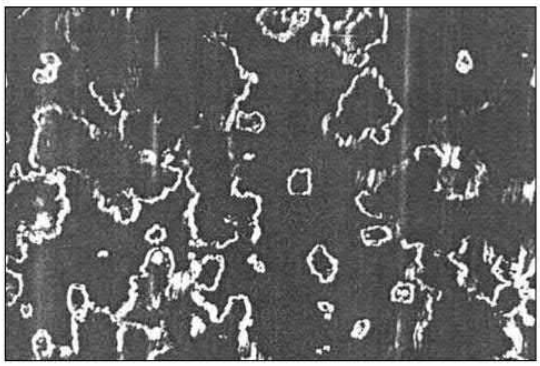


Рис. 3. Фотография частиц сухого лецитина (с увеличением 500Х)

и летучих веществ – 0,8 %; массовая доля веществ, не растворимых в этиловом эфире, – 1,2 %; кислотное число масла, выделенного из концентрата, – 8 мг КОН/г; перекисное число – 10 ммоль/кг ½ O_2.

Экстракцию проводили при температуре (35–55) ± 1 °С и интенсивном перемешивании (частота вращения мешалки составляла 200–300 об./мин). Анализ конечного продукта на содержание

основного вещества и примесей проводили аналогично [5]. В результате определили оптимальный технологический процесс выделения фосфолипидов [6], проходящий в 3 стадии:

- *первая* — масло из фосфатидного концентрата экстрагировали ацетоном в соотношении *фосфатидный концентрат* : *ацетон* как 1 : (3,7—4,0) массовых частей с последующей фильтрацией;
- *вторая* – масло и свободные жирные кислоты из выделенных фосфолипидов экстрагировали ацетоном в соотношении *фосфолипиды*: *ацетон* как 1 : (5,6—6,6) массовых частей с последующей фильтрацией;
- *третья* — промывка фосфолипидов ацетоном в соотношении *фосфолипиды* : *ацетон* как 1 : (0,8—0,94) массовых частей с последующей фильтрацией.

Следует подчеркнуть, что фильтрация раствора триглицеридов и свободных жирных кислот в ацетоне на каждой из вышеперечисленных стадий позволила получить лецитин высокого качества.

Сравнительные характеристики лецитина из подсолнечника и сои, проведенные фирмой «Лукас Майер» (Lucas Mayer), показали, что по основным показателям они идентичны, а некоторые показатели (содержание триглицеридов и свободных жирных кислот) лецитина из подсолнечника превосходят аналогичные показатели соевого лецитина [7].

Отработку режимов фильтрации и подбор фильтровальной ткани проводили на лабораторной стаканчиковой центрифуге ТВ-600 (рис. 4.) с такими характеристиками:

рабочая емкость фильтрующих стаканов, см^3	190
высота, мм	190
частота вращения, об./мин	1650, 2050, 2350, 2380
фактор разделения $F_р$	660, 830, 1440, 1900
фильтрующая основа	сетка СД-56, ткань ЛТФ-5, бельтинг, стеклоткань
электрический привод	ЭКТ-2Д 25/380-50УХЛ4
масса, кг	500

Эксперименты проводили следующим образом. В стаканчики устанавливали фильтрующую перегородку и заливали суспензию с t = = 50 ± 2 °С (твердая фаза – фосфатиды, жидкая фаза — раствор подсолнечного масла в ацетоне, соотношение твердой фазы к жидкой варьируется в пределах от 1 : 3 до 1 : 5). После включения центрифуги и ее работы в течение трех минут доливали суспензию. Циклы повторяли до визуального определения момента, когда жидкая фаза оставалась в стаканчике. После этого измеряли толщину слоя и массу осадка. Фактор разделения рассчитывали по формуле

$$F_р = \frac{\omega^2 D}{2g}, \qquad (10)$$

где $\omega = 2\pi(n/60)$ – угловая скорость вращения ротора, n – число оборотов ротора в минуту, D = = 630 мм – диаметр ротора.

Частота вращения замерялась на валу электродвигателя с помощью тахометра ИО-30 и пересчитывалась для ротора центрифуги по передаточному отношению.

Анализ полученных результатов показал, что для фильтрации предпочтительно использовать ткани ЛТФ-5, а частота вращения не должна превышать 600 об./мин., фактор разделения должен составлять 126,6.

Особенность процесса сушки лецитина — его термолабильность, что требует ограничения температуры теплоносителя, исключения температурных неоднородностей, местных перегревов материала. Предпочтительными для лецитина с точки зрения соответствия требованиям процесса сушки являются сушилки с

Таблица 3

Гранулометрический состав сухого лецитина

Размер пор, мкм	10	11—25	25—50	50—100	100—200	200—500	500
Количество пор, %	24,96	8,03	9,25	14,31	14,66	13,44	15,35

режимом виброаэрокипящего слоя [1]. В наибольшей степени сформулированным требованиям соответствует конструкция сушилки [8], которая обеспечивает устойчивую виброаэрокипящую зону по всей высоте сушильной камеры с постоянно обновляющейся поверхностью контактирования материала с газообразным теплоносителем.

Процесс сушки лецитина отрабатывали на опытно-промышленной установке, представленной на рис. 5. Сушилка представляла собой вертикальный цилиндр (диаметр – 100 мм, высота – 800 мм) из двух царг стекла «Simax», имеющих рубашки обогрева. Последние дополняли царгами (диаметр – 100 мм, высота – 70 мм), выполненными из стали Х18Н10Т, куда вваривали два штуцера диаметром 50 мм для ввода и вывода материала. Насадку, секционирующую сушилку по высоте, изготовили из проволоки, материал – сталь 07Х25Н13.

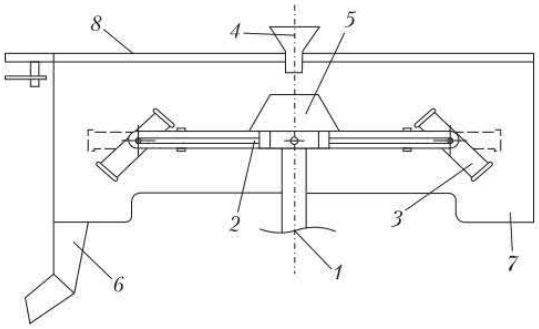


Рис. 4. Стаканчиковая центрифуга: *1* – вал ротора; *2* – крестовина; *3* – фильтрующие стаканы; *4* – верхняя воронка; *5* – питающий патрубок; *6* – сливной патрубок; *7* – корпус центрифуги; *8* – крышка центрифуги

Диаметр проволоки для цилиндрической пружины составлял 4 мм, для спиралей Архимеда – 2 мм, диаметр цилиндрической пружины – 960 мм, высота – 800 мм. Газораспределитель-

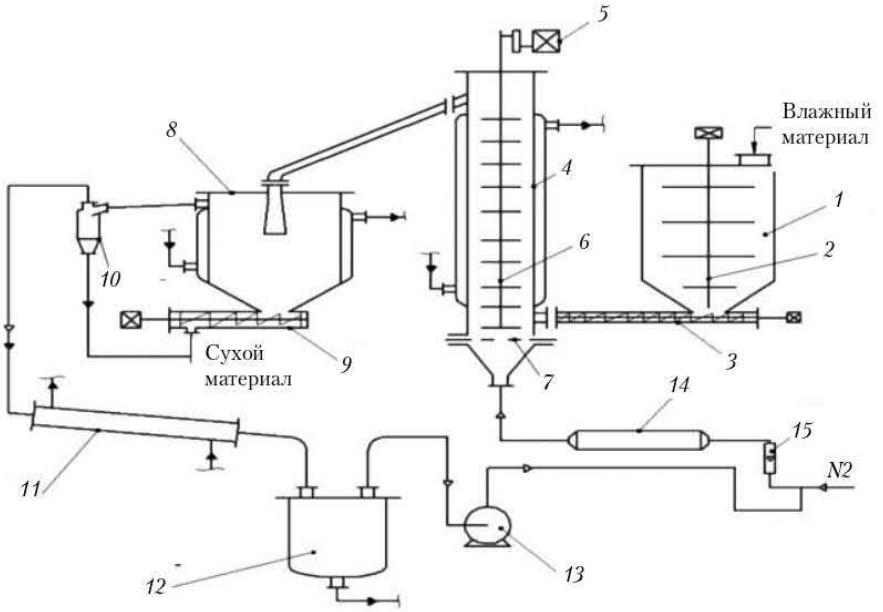


Рис. 5. Принципиальная схема опытно-промышленной установки сушки лецитина: *1* – бункер-дозатор; *2* – ворошитель; *3, 9* – шнеки; *4* – виброаэросушилка; *5* – привод; *6* – пружинная насадка; *7* – газораспредилительная решетка; *8, 12* – приемники; *10* – циклон; *11* – холодильник; *13* – вакуум-насос; *14* – электрокалорифер; *15* – ротаметр

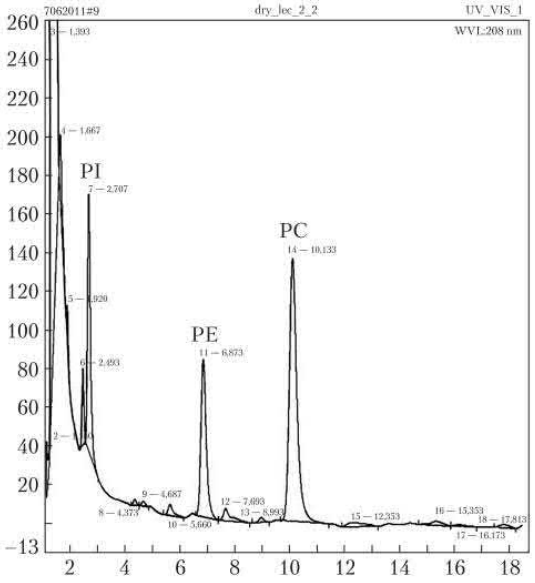


Рис. 6. Хроматограмма состава сухого подсолнечного лецитина: PI – фосфатидилинозитол, PE — фосфатидилэтаноламин, PC — фосфатидилхолин

ная решетка сушилки провального типа выполнена из фторопласта-4; свободное сечение составляло 5 %, диаметр отверстий – 2 мм.

Работа установки заключалась в следующем: лецитин с 20%-ым содержанием ацетона через люк загружался в бункер-дозатор *1* с выполненным в виде многорядной мешалки ворошителем *2*. Из бункера-дозатора лецитин шнеком *3* постоянно подавался на газораспределительную решетку *7* виброаэросушилки *4*. Корпус сушилки *4* термостатировался подачей воды с $t = 60 \pm 2$ °С в рубашку обогрева. Одновременно под газораспределительную решетку *7* через ротаметр *15* и электрокалорифер *14* в сушилку поступал азот с $t = 60 \pm 2$ °С. Вибрация пружинной насадки *6* осуществлялась электродвигателем с кривошипно-шатунным механизмом (частота вращения – 25 Гц, амплитуда — 3 мм), от которого энергия передавалась насадке при помощи штанги. Горизонтальные спирали Архимеда вибрировали благодаря жесткому креплению к внутренней поверхности витка цилиндрической пружины. Материал и газ-теплоноситель перемещались вверх к разгрузочному устройству. Таким образом, процесс осуществлялся при прямоточном однонаправленном движении газообразного теплоносителя и материала, что создавало условия «бережной» сушки: теплоноситель с максимальной температурой контактировал с наиболее влажным материалом, что особенно важно для термолабильных веществ.

Высушенный лецитин вместе с теплоносителем через выпускную трубу поступал в приемник *8*, снабженный рубашкой обогрева и шнеком для выгрузки продукта, который термостатировался подачей воды с $t = 65 \pm 2$ °С в рубашку для предотвращения конденсации паров ацетона. Частицы лецитина дополнительно улавливались в циклоне *10*, куда поступала запыленная парогазовая смесь из приемника *8*. Пары ацетона из циклона *10* вместе с газом-теплоносителем прокачивались вакуум-насосом *13* через холодильник *11*, в котором ацетон конденсировался. Конденсат собирался в сборнике *12*.

На установке отработаны технологические режимы сушки лецитина. Основные показатели работы:

- удельная производительность по сухому материалу и испаренной влаге – 1116 и 196 кг/м^3 · ч соответственно;
- удельная материалоемкость – 24 кг/кг·ч;
- потребление электроэнергии на 1 кг сухого лецитина – 0,6 кВт · ч/кг;
- содержание ацетона в лецитине <0,02 мг/кг, влаги – 0,8 %.

В результате эксплуатации лабораторной и опытно-промышленной установок получены образцы сухого лецитина из подсолнечного фосфатидного концентрата, состав которого представлен на рис. 6.

Наличие фосфолипидов в «сыром» нерафинированном масле в количестве 0,6–1,2 % приводит к образованию значительного количества баковых отстоев – фузистого масла, которое, практически, не имеет рентабельного сбыта, а при длительном хранении становится прак-

тически невостребованным. Рафинация же масел с высоким содержанием фосфатидов на перерабатывающих предприятиях приводит к значительным потерям масла с гидратационным осадком, который, как правило, смешивается с соапстоками, что значительно снижает потребительскую ценность последних. Экономически целесообразным решением этой проблемы является гидратация масел с последующим получением фосфатидного концентрата.

Масложировая промышленность выпускает фосфатидные концентраты с разным содержанием фосфатидов и масла (см. табл. 4).

Как видно из табл. 4, содержание масла в фосфатидных концентратах различных марок заметно отличаются. Поэтому при использовании в качестве сырья кормового фосфатидного концентрата невозможно получить качественный сухой лецитин. Это объясняется тем, что хотя после первой экстракции (соотношение массовых частей фосфатидный концентрат : ацетон – 1 : (3,7—4,0)) фазы разделялись, однако фосфолипиды выделялись в виде вязкой резиноподобной субстанции, что делало невозможным дальнейшее проведение процесса фильтрации.

С целью определения возможности использования фосфатидного концентрата любой марки дополнительно была исследована экстракция первой стадии получения лецитина. В результате разработана универсальная технология выделения фосфолипидов [9], заключающаяся в том, что на первой стадии масло фосфатидного концентрата экстрагируют ацетоном в соотношении *масло* (содержащееся в фосфатидном концентрате) : *ацетон* как 1 : (9,25–10,00) массовых частей с последующей фильтрацией.

На основании проведенных исследований была спроектирована и создана опытно-промышленная установка получения лецитина из подсолнечного фосфатидного концентрата, упрощенная технологическая схема которой представлена на рис. 7.

Работа установки заключалась в следующем. Из сборника *1* предварительно нагретый до температуры 50 ± 2 °С фосфатидный концентрат шестиренчатым насосом *2* подавался в экстрактор первой ступени *3*, снабженный обратным холодильником *5*. Экстрактор представлял собой емкостной аппарт с мешалкой и рубашкой обогрева. В экстрактор *3* из сборника подавался ацетон. Сырье в экстрактор *3* подавалось в соотношении *масло* (содержащееся в фосфатидном концентрате) : *ацетон* как 1 : 9,6 массовых частей. Экстракцию проводили в течение 30 ± 2 мин при температуре 35 ± 5 °С и интенсивном перемешивании, которое обеспечивалось мешалкой и вихревым насосом *4*. Последний обеспечивал постоянную рециркуляцию суспензии в экстракторе *3*. По окончании процесса суспензия подавалась в фильтрующую центрифугу первой ступени *9*, где проходило разделение фаз. Жидкая фаза (раствор масла в ацетоне) направлялась в сборник *11*, а твердая (фосфолипиды) – в экстрактор второй ступени *7*. Экстрактор второй ступени 7 полностью аналогичен экстрактору *3*. В экстрактор *7* из сборника подавался ацетон. Сырье в экстрактор *7* подавалось в соотношении *фосфолипиды* : *ацетон* как 1 : 6 массовых частей. Экстракцию проводили в течение 20 ± 2 мин при температуре 35 ± 5 °С и интенсивном перемешивании, которое обеспечивалось мешалкой и вихревым насосом *8*. По окончании процесса суспензия подавалась в фильтрующую

Таблица 4

Содержание фосфолипидов и масла в фосфатидном концентрате [5]

Физико-химические показатели	Наименование			
	Марки пищевых концентратов			Марки кормовых концентратов
	$С_ц$Х–1, $С_ц$ВХ–1 СХ–1	$С_ц$Х–2, $С_ц$ВХ–2 СХ–2	$С_ц$Х–3, СХ–3	$С_ц$К, СК
Массовая доля фосфатидов, %, не менее	60,0	55,0	50,0	40,0
Массовая доля масла, %, не более	40,0	45,0	50,0	60,0

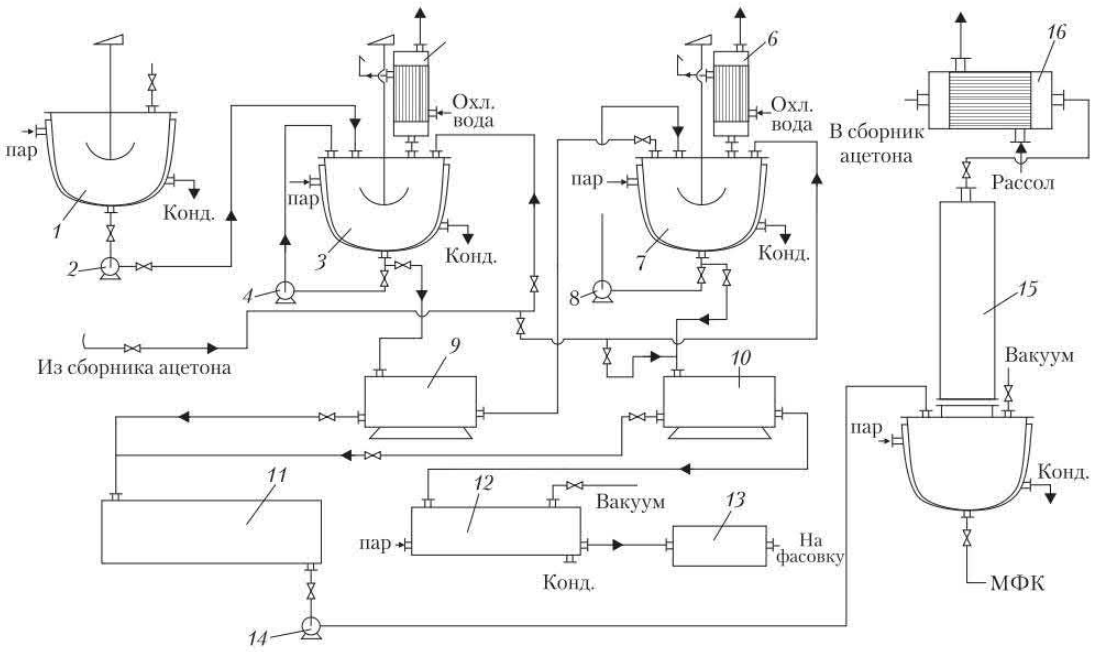


Рис. 7. Упрощенная технологическая схема производства сухого лецитина: *1* – сборник фосфатидного концентрата; *2* – насос шестеренчатый; *3* – экрастрактор I-ой ступени; *4*, *8* – вихровые насосы; *5*, *6* – обратные холодильники; *7* – экстрактор II-ой ступени; *9*, *10* – центрифуги; *11* – сборник раствора масла в ацетоне; *12* – сушилка; *13* – измельчитель; *14* – центорбежный насос; *15* – ректификационная колонна; *16* – холодильник

Таблица 5

Органолептические и физико-химические характеристики лецитина

Наименование показателей	Лецитин	Диетическая добавка «Лецитин»
Внешний вид	Сыпучая порошкообразная масса без посторонних включений	
Запах	Без запаха, безвкусный, едва заметный специфический вкус и запах используемого масла; не допускается какой-либо другой вкус и запах	
Цвет	От желтовато-серого до желтовато-коричневого	
Массовая доля влаги, %, не более	1,4	1,4
Массовая доля масла, %, не более	1,5	1,5
Перекисное число выделенного масла, ммоль/кг ½ O_2, не более	10,0	7,0
Кислотное число мг КОН/г, не более	32,0	24,0
Массовая доля веществ, не растворимых в этиловом эфире %, не более	2,0	1,5
Массовая доля фосфолипидов, %, не менее	95,1	95,6
pH 1%-ого водного раствора	6–7	6–7

центрифугу второй ступени *10*, где проходило разделение фаз. Жидкая фаза (раствор масла и свободных жирных кислот в ацетоне) направлялась в сборник *11*, а твердая (фосфолипиды) – оставалась в центрифуге *10*. В последнюю из сборника подавали ацетон для промывки в соотношении *фосфолипиды* : *ацетон* как 1 : 0,85 массовых частей. Затем включали центрифугу *10* и разделяли фазы. Жидкую фазу (раствор остатков масла и свободных жирных кислот в ацетоне) направляли в сборник *11*, а твердую – в сушилку *12*. Процесс сушки проводили при температуре 55 ± 5 °С в течение 6 час. Высушенный лецитин направляли в измельчитель *13*, откуда подавали на фасовку. Раствор масла и свободных жирных кислот из сборника *11* центробежным насосом *14* подавали в куб ректификационной колонны *15*. Пары ацетона конденсировали в холодильнике *16*, откуда направляли в сборник ацетона для дальнейшего использования, а масло фосфатидного концентрата из куба колонны *15* подавали на дальнейшую переработку.

Результаты эксплуатации опытно-промышленной установки полностью подтвердили выводы и технологические решения, разработанные на стадиях лабораторных исследований. Органолептические и физико-химические показатели полученного лецитина представлены в табл. 5. В таблице приведены показатели как лецитина, используемого в пищевой промышленности, так и диетической добавки «Лецитин», используемой в рационе питания населения.

В настоящее время разработаны технические условия и исходные данные на проектирование промышленного производства лецитина из подсолнечного фосфатидного концентрата в количестве 30 т в месяц.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сажин Б.С.* Основы техники сушки. – М.: Химия, 1984. – 319 с.
2. *Глух И.С., Школа О.И., Отченашев О.Д.* Анализ химических реактивов как объектов сушки. – В кн.: Новые процессы и оборудование получения веществ реактивной квалификации. Днепропетровск, 1995, ч. 1 – с. 14–15.
3. *Хахенберг Х., Шмидт А.* Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы. – М.: Мир, 1979. – 159 с.
4. *Витенберг А.Г., Иоффе Б.В.* Газовая экстракция в хроматографическом анализе. – Ленинград: «Химия», Ленинградское отделение, 1982. – 279 с.
5. *Концентрати* фосфатидні. Технічні умови СОУ 15.4-37-212:2004.
6. *Патент* на винахід № 81822. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Бюл. № 3, 11.02.2008.
7. *Глух И.С., Школа О.И., Клочкова В.Е. и др.* Аспекты применения подсолнечного лецитина в пищевой промышленности. Наукові праці. – Одеса, 2009. – випуск 36, т. 2, с. 177—179.
8. *А. с. СССР* 1210030 Установка для сушки мелкодисперсных материалов в виброаэрокипящем слое Б.И. № 5, 1985. Глух И.С., Солодовников В.В., Шевченко Ю.Л. и др.
9. *Патент* на корисну модель № 54922. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Бюл. № 22, 26.11.2010.

С.М. Шульга, А.І. Глух, І.С. Глух, О.Л. Дроздов, О.І. Школа

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУХОГО ЛЕЦИТИНУ З ФОСФАТИДНОГО КОНЦЕНТРАТУ СОНЯШНИКА

Наведені результати досліджень сорбційно-структурних властивостей сухого соняшникового лецитину. На основі експериментальних та теоретичних досліджень встановлені оптимальні режими роботи апаратів, які використовуються у розробленій технології отримання лецитину.

Ключові слова: лецитин, фосфатидний концентрат, екстракція, сушіння.

S.M. Shulga, A.I. Glukh, I.S. Glukh, O.L. Drozdov, O.I. Shkola

THE DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF DRY LECITHIN OBTAINING FROM SUNFLOWER PHOSPHATIDE CONCENTRATE

The results of sorption and structural properties studies of dry sunflower lecithin are presented. Based on experimental and theoretical studies optimal operation conditions of devices used in the developed technology of lecithin are determined.

Key words: lecithin, phosphatide concentrate, extraction, drying.

Стаття надійшла до редакції 20.02.12

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90512** (13) **U**

(51) МПК (2014.01)
A23J 7/00
A61K 9/38 (2006.01)
A61K 9/64 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 00497**

(22) Дата подання заявки: **20.01.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.05.2014**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.05.2014, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
Глух Ігор Семенович (UA),
Глух Андрій Ігорович (UA),
Шульга Сергій Михайлович (UA),
Дроздов Олексій Леонідович (UA)

(73) Власник(и):
Глух Ігор Семенович,
вул. Артема, 90-д, кв. 11, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA),
Глух Андрій Ігорович,
вул. Дзержинського, 8, кв. 76, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA),
Шульга Сергій Михайлович,
вул. Вишгородська, 47-б, кв. 105, м. Київ, 04114 (UA),
Дроздов Олексій Леонідович,
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49027 (UA)

(74) Представник:
Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ ІЗ ФОСФАТИДНОГО КОНЦЕНТРАТУ

(57) Реферат:

Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату включає двостадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном при Т=25-55 °С, його проміжні фільтрації, промивку ацетоном у третій стадії та фінішну фільтрацію. Фільтрацію фосфатидного концентрату у першій стадії здійснюють при Т=65-69 °С, крізь фільтраційні пори діаметром ≤3 мкм.

UA 90512 U

Корисна модель належить до готування білкових сполук, техніки обробки білків, одержання композицій, складів, вміщуючих фосфатиди, здебільше лецитин, також виділення лецитину з фосфатидних концентратів, і може бути використаною у харчовій, олійно-жировій, комбікормовій, медичній, фармацевтичній або біохімічній промисловості при виробництві харчових або лікарських продуктів.

Відомий спосіб виділення фосфатидів із фосфатидного концентрату, що включає розчинення фосфатидного концентрату у гексані, як неполярному розчиннику, при співвідношенні масових частин 1:1, відділення фосфоліпідів від жирів і решти речовин шляхом змішування з водою, при співвідношенні 1,0-1,5:1,0, відстоювання, ущільнення та зневоднення шляхом нагрівання відокремленого до Т=60-80 °С впродовж 20-30 хв. За цих умов фосфоліпіди гідратуються, втрачають розчинність, а після відстоювання переходять у дрібнодисперсний осад, відокремлюючись від гексану [1]. Недоліками способу є утворення тяжкозневоднюваного осаду та інактивація лецитину, внаслідок недоопрацювання режиму зневоднення осаду шляхом нагрівання.

Інший відомий спосіб виділення фосфатидів із фосфатидного концентрату характеризується екстрагуванням фосфатидного концентрату ацетоном, у співвідношенні масових частин 1:2, відповідно, а надалі, у співвідношенні 1:1, при Т=50-55 °С, з наступними охолодженням до кімнатної Т і декантуванням рідинної фази [2]. Недоліки процесу полягають в труднощах досягнення високої чистоти лецитину.

Більш наближеним до заявленої корисної моделі серед об'єктів аналогічного призначення за сукупністю істотних ознак є спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, що включає двостадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном при Т=25-55 °С, його проміжні фільтрації, промивку ацетоном на третій стадії та фінішну фільтрацію, де олію, утримувану фосфатидним концентратом, на першій стадії додатково екстрагують ацетоном, дотримуючись співвідношення масових частин 1,0:9,25-10,0 [3]. Наближений спосіб декілька поліпшує чистоту лецитину, завдяки опрацюванню умов проведення першої технологічної фази. Проте, у його вмісті ще залишається до 2,6-3,9 % різних нерозчинних фракцій, що заперечує вимогам ТУУ 020-70758.001-99, ТУУ 15.7-03598943-014:2007, де їхній рівень повинен сягати <1,5 та <0,2 %, відповідно. Це істотно ускладнює реалізацію сучасних стандартів при виробництві як харчових, так і фармацевтичних продуктів. Труднощі вирішення даної проблеми зумовлені, переважно, різноманітністю складу фосфатидного концентрату, а також складністю вмісту утримуваних речовин, нерозчинних в етиловому ефірі. Так, згідно з СОУ 15.4-37-212:2004 олійно-жирова промисловість виробляє фосфатидні концентрати з наступним вмістом речовин, які нерозчинні в етиловому ефірі (див. Табл. 1).

Походження нерозчинних фракцій зумовлене наявністю в лецитині значної кількості волокон целюлози, яка не розчиняється у органічних розчинниках, а тому не відділяється від лецитину під час екстракції олії ацетоном [4].

Фосфатидний концентрат утворюється при гідратації олії та вміщує (%):

- фосфоліпідів - 58, олії - 39, вологи - 0,65, нерозчинних в етиловому ефірі - 2,35 (Пологівський ОЕЗ);

- фосфоліпідів - 67, олії - 31, вологи - 0,15, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,82 (Запорізький ОЕЗ);

- фосфоліпідів - 63, олії - 35, вологи - 0,2, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,8 (Полтавський ОЕЗ).

Таким чином, при отриманні лецитину згідно прототипу, в останньому залишається: 3,85 %, 2,64 %, 2,77 % речовин, нерозчинних в етиловому ефірі відповідно.

До основи даної корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, застосування котрого сприяло б підвищенню чистоти лецитину шляхом опрацювання технологічної фази, зв'язаною з виділенням речовин, нерозчинних у етиловому ефірі.

Поставлена задача вирішується тим, що при здійсненні у відомому способі виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, що включає двостадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном при Т=25-55 °С, його проміжні фільтрації, промивку ацетоном у третій стадії та фінішну фільтрацію, відповідно до корисної моделі, фільтрацію фосфатидного концентрату у першій стадії здійснюють при Т=65-69 °С, крізь фільтраційні пори діаметром ≤3 мкм.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному.

Фільтрація сировини саме на першій стадії процесу зумовлена необхідністю відокремити волокна целюлози, які не розчиняються у органічних розчинниках, а тому не відділяється з лецитину під час екстракції олії ацетоном [4].

Температурний режим фільтрації, заданий в межах 65-69 °С, є оптимальним, адже нагрівання фосфатидного концентрату до Т>69 °С викликатиме деструкцію фосфатидів, а при Т<69 °С - гальмуватиме швидкість фільтрації, з-поза підвищення в'язкості фосфатидного концентрату.

Оптимальний діаметр фільтраційних пор, відповідний значенню ≤3 мкм, ґрунтується на результатах мікроскопічного аналізу фракцій лецитину, нерозчинних етиловим ефіром [5], з використанням біологічного мікроскопа фірми "Biolar" (Польща), що має високу чутливість й допускає визначення діаметра мікроскопічних фракцій з точністю ±0,2 мкм. Гранулометричні виміри довели необхідність застосування фільтруючих матеріалів з діаметром пор ≤3 мкм, оскільки діаметр нерозчинних 90 % фракцій сягає понад 3 мкм.

Тому сукупність відмітних ознак заявленої корисної моделі є "суттєвою" за наявністю причинно-наслідкового зв'язку з перевершенням вищенаведеного технічного результату, "новою" в техніці досліджуваного напряму і поширюється на усі випадки багаторазового використання.

Суть. Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату характеризується проведенням фільтрації фосфатидного концентрату на першій стадії технологічного процесу, через фільтраційний матеріал, діаметр пор котрого не перевищує 3 мкм, при Т=65-69 °С, двостадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном при Т=25-55 °С, його проміжні фільтрації, промивку ацетоном у третій стадії та фінішну фільтрацію. За цих умов підвищують чистоту лецитину, перевершуючи норми вищезазначених ТУУ й вихід фосфоліпідів за прототипом (див. Табл. 2).

Приклад 1

100 г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (фосфатидів - 60 %, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,48 %), підігрітого до Т=67 °С, фільтрують скрізь фільтрувальну тканину Бєльтінг (артикул 2030 по ГОСТ 332) на воронці Бюхнєра, що підігрівається водою з Т=67 °С з термостату. Через 10 хв процес фільтрації завершується, отримують 98,44 г фосфатидного концентрату.

До 98,44 г відфільтрованого фосфатидного концентрату додають 400 г (506 мл) ацетону, суміш нагрівають до Т=45 °С і інтенсивно перемішують 5 хв. Суспензію охолоджують до кімнатної Т, фільтрують. Одержують 73,3 г осаду. До 73,3 г осаду додають 494 г (625 мл) ацетону, суміш нагрівають до Т=45 °С і інтенсивно перемішують 5 хв. Суспензію охолоджують до кімнатної Т і фільтрують. Одержують 68,3 г осаду. До 68,3 г осаду додають 65,7 г (83 мл) ацетону, суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хв і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при Т=30-35 °С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1 мм і одержують 56,74 г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 41,7 г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 959,7 г (1214 мл).

Приклад 2

100 г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (фосфатидів - 60 %, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,48 %), підігрітого до Т=45 °С, фільтрують скрізь фільтрувальну тканину Бєльтінг (артикул 2030 по ГОСТ 332) на воронці Бюхнєра, що підігрівається водою з Т=45 °С з термостату. Через 40 хв процес фільтрації завершується, отримують 98,44 г фосфатидного концентрату.

До 98,44 г відфільтрованого фосфатидного концентрату додають 400 г (506 мл) ацетону, суміш нагрівають до Т=45 °С і інтенсивно перемішують 5 хв. Суспензію охолоджують до кімнатної Т і фільтрують. Одержують 73,3 г осаду. До 73,3 г осаду додають 494 г (625 мл) ацетону, суміш нагрівають до Т=45 °С і інтенсивно перемішують 5 хв. Суспензію охолоджують до кімнатної Т і фільтрують. Одержують 68,3 г осаду. До 68,3 г осаду додають 65,7 г (83 мл) ацетону, суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хв і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при Т=30-35 °С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1 мм і одержують 56,74 г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 41,7 г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 959,7 г (1214 мл).

Спосіб реалізований на стандартному обладнанні.

Запропоноване рішення задачі відповідає умові "промислова придатність", оскільки відповідає нормам сучасних стандартів, перевершує досягнення об'єктів минулого покоління, стаючи корисним у виробництві продуктів у харчовій, олійно-жировій, комбікормовій, медичній, фармацевтичній або біохімічній промисловості, за використанням засобів, що стали відомі з рівня техніки й поєднані з рішенням поставленої задачі за пріоритетом.

Обсяг технічного рішення, що затребуваний заявником і зазначений у Формулі, визначає відмінність від прототипу, що допускає набуття ним правового статусу як корисної моделі процесу.

Таблиця 1

Найменування	Харчові			Кормові
Фізико-хімічні показники	СнХ-1, СнВХ-1, СХ-1	СнХ-2, СнВХ-2, СХ-2	СнХ-3, СХ-3	СнК, СК
Масова частка речовин, що нерозчинні в етиловому ефірі, %, не більше ніж	1,5	2,0	3,0	5,0

Таблиця 2

Найменування показників	Прототип (сировина Пологівського ОЕЗ)	Прототип (сировина Запорізького ОЕЗ)	Прототип (сировина Полтавського ОЕЗ)	Запропонований спосіб
Зовнішній вигляд	Сипуча порошкоподібна маса без сторонніх включень			
Запах та смак	Без запаху, безсмачний			
Колір	Жовтувато-коричневий			
Масова частка вологи, %	1,2	1,2	1,2	1,2
Масова частка олії, %	1,5	1,5	1,5	1,5
Масова доля речовин, нерозчинних в етиловому ефірі	3,85	2,64	2,77	0,18
Масова частка фосфоліпідів, %	93,45	94,66	94,53	97,12

Аналоги:

1. Спосіб виділення фосфатидів із фосфатидного концентрату: Пат. 45451 України, МПК C07F 9/10, C07C 7/00 /Мельников К.О., Шмалько П.Є., Марочко В.А, Михайлик О.М., Школа О.І., Анисимов А.П., Кармазіна Т.П. (Україна); Дніпропетровський державний аграрний університет (Україна); Український державний хіміко-технологічний університет (Україна). - № 98116293; заявл. 27.11.98; опубл. 15.04.02.

2. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату: Пат.70870 України, МПК C07F 9/10, C07C 7/00 /Мельников К.О., Мельник М.М., Школа О.І., Кобзар М.В. (Україна); Дніпропетровський державний аграрний університет (Україна). - № 20031213149; заявл. 30.12.03; опубл. 15.10.04.

3. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату: Пат.54922 України, МПК A23D 9/00, A23J 7/00 /Шульга СМ., Глух А.І., Глух І.С., Школа О.І. (Україна). - № u201007237; заявл. 11.06.10; опубл. 25.11.10.

4. "Большая Российская энциклопедия". - Хімічна енциклопедія. - М., 1998. - Т.5. - С. 336.

5. Плановский А.Н., Муштаев В.И., Ульянов В.М. Сушка дисперсных материалов в химической промышленности. - М.: Химия, 1979. - 286 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, що включає двостадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном при Т=25-55 °С, його проміжні фільтрації, промивку ацетоном у третій стадії та фінішну фільтрацію, який **відрізняється** тим, що фільтрацію фосфатидного концентрату у першій стадії здійснюють при Т=65-69 °С, крізь фільтраційні пори діаметром ≤3 мкм.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **90511** (13) **U**

(51) МПК (2014.01)
A23J 7/00
C12H 1/065 (2006.01)
B04B 3/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 00495**
(22) Дата подання заявки: **20.01.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.05.2014**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.05.2014, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
Глух Ігор Семенович (UA),
Глух Андрій Ігорович (UA),
Шульга Сергій Михайлович (UA),
Дроздов Олексій Леонідович (UA)

(73) Власник(и):
Глух Ігор Семенович,
вул. Артема, 90-д, кв. 11, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA),
Глух Андрій Ігорович,
вул. Дзержинського, 8, кв. 76, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA),
Шульга Сергій Михайлович,
вул. Вишгородська, 47-б, кв. 105, м. Київ, 04114 (UA),
Дроздов Олексій Леонідович,
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49027 (UA)

(74) Представник:
Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ ІЗ ФОСФАТИДНОГО КОНЦЕНТРАТУ

(57) Реферат:

Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату включає трихстадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном і фільтрацію щоразу, де на першій стадії фосфатидний концентрат змішують з ацетоном у співвідношенні мас. частин 1,0:9,25-10,0, відповідно, й виділяють з нього фосфоліпіди, при Т=25-55 °С, на другій - екстрагують олію, вільні жирні кислоти, на третій - промивають фосфоліпіди, переганяють і виводять з процесу ацетоновий екстракт. Відокремлення фаз проводять центрифугуванням, з факторами розділення ≤100, ≤150, ≤200, впродовж 60-65, 40-45 й 30-35 хв, на першій, другій і третій стадіях, відповідно.

UA 90511 U

Застосування центрифуги, з фактором розділення ≤200 і проведення відокремлення фаз впродовж 30-35 хв, на третій стадії дозволяє зменшити технологічний час в порівнянні з друк-фільтром у майже 1,5 рази.

Можливість постадійного збільшення фактора розділення та зменшення часу фільтрації зв'язується з послідовним зменшенням вмісту олії й вільних жирних кислот в осаді фосфоліпідів.

За цих умов зменшення часу фільтрації допускає підвищення продуктивності процесу відносно прототипу майже у 1,5 рази.

За наявністю причинно-наслідкового зв'язку з перевершенням вищенаведеного технічного результату сукупність відмітних ознак заявленої корисної моделі є "суттєвою", а в техніці досліджуваного напряму - "новою", що поширюється на усі випадки її багаторазового використання.

Суть. Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату реалізується на стандартному обладнанні, з використанням промислових центрифуг України [4], з факторами розділення у новозаданих режимах і застосуванням тиристорного електропривода ЕКТ 4 Д2-63-50 УХЛЧ ОАО "Запорізького електроапаратного заводу".

Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату характеризується тристадійною обробкою фосфатидного концентрату ацетоном і проведенням фільтрацій щоразу. На першій стадії фосфатидний концентрат змішують з ацетоном у співвідношенні мас. частин 1,0:9,25-10,0, відповідно, де при Т=25-55 °С виділяють з нього фосфоліпіди. На другій стадії екстрагують олію, вільні жирні кислоти, а на третій - промивають фосфоліпіди, переганяють і виводять з процесу ацетоновий екстракт. Для підвищення продуктивності фільтрації проводять за допомогою центрифуг з факторами розділення ≤100, ≤150, ≤200, впродовж 60-65, 40-45 й 30-35 хв, на першій, другій і третій стадіях, відповідно. Це дозволяє підвищити продуктивність майже у 1,5 рази, відносно прототипу (див. Табл).

Обґрунтування вищезазначеного технічного результату в експерименті проводили, застосовуючи стаканчикові центрифуги ТВ-600 (Експериментальна установка № 762 "Стаканчикова центрифуга". УкрНДІхіммаш, м. Харків). При факторі розподілу 660 констатували забивання фільтруючої перегородки, а відтак припиняли фільтрацію через надмірний стиск твердої фази в умовах відцентрованої фільтрації, адже залишалося ~30-35 % рідкої фази від маси осаду. За серією спостережень більш доцільним (для фосфатидних концентратів усіх марок) було застосування центрифуг з факторами розподілу ≤100 впродовж 60-65, ≤150 впродовж 40-45 хв і ≤200 впродовж 30-35 хв, для першої, другої й третьої стадій, відповідно. При збільшенні фактора розподілу >100, >150 і >200 для першої, другої й третьої стадій, відповідно, спостерігалося забивання фільтруючої перегородки (залишалася рідка фаза).

Приклад 1.

100 г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (фосфатидів - 60 %, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,48 %), підігрітого до Т=67 °С, фільтрували крізь фільтрувальну тканину Бєльтінг (артикул 2030 по ГОСТ 332) на воронці Бюхнєра, підігріту водою до Т=67 °С. Через 10 хв процес фільтрації завершували, отримуючи 98,44 г фосфатидного концентрату.

До 98,44 г відфільтрованого фосфатидного концентрату додавали 400 г (506 мл) ацетону, суміш нагрівали до Т=45 °С та інтенсивно перемішували впродовж 5 хв. Суспензію охолоджували до кімнатної Т й вводили у центрифугу з фактором розподілу 100. Через 60 хв процес завершували, одержуючи 73,3 г осаду. До 73,3 г осаду додавали 494 г (625 мл) ацетону, суміш нагрівали до Т=45 °С та інтенсивно перемішували 5 хв. Суспензію охолоджували до кімнатної Т і подавали у центрифугу з фактором розподілу 150. Через 40 хв процес завершували, одержуючи 68,3 г осаду. До 68,3 г осаду додавали 65,7 г (83 мл) ацетону, суміш інтенсивно перемішували при кімнатній Т впродовж 5 хв і вводили у центрифугу з фактором розподілу 200. Через 30 хв процес завершували. Осад висушували при Т=30-35 °С, під вакуумом, потім просіювали через сито, з діаметром отворів 1 мм, і одержували 56,74 г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт перегоняли на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержували 41,7 г залишку, що містив тригліцериди, жирні кислоти та сліди вологи. Загальні витрати ацетону складали 959,7 г (1214 мл).

Приклад 2.

100 г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (фосфатидів - 60 %, нерозчинних в етиловому ефірі - 1,48 %), підігрітого до Т=67 °С, фільтрували скрізь фільтрувальну тканину Бєльтінг (артикул 2030 по ГОСТ 332) на воронці Бюхнєра, підігрітій водою Т=67 °С з термостату. Через 10 хв процес фільтрації завершували, отримували 98,44 г фосфатидного концентрату.

До 98,44 г відфільтрованого фосфатидного концентрату додавали 400 г (506 мл) ацетону, суміш нагрівали до Т=45 °С й інтенсивно перемішували впродовж 5 хв. Суспензію охолоджували до кімнатної Т і вводили в центрифугу з фактором розділення 50. Через 65 хв процес завершували, одержуючи 73,3 г осаду. До 73,3 г осаду додавали 494 г (625 мл) ацетону, суміш нагрівали до Т=45 °С і інтенсивно перемішують 5 хв. Суспензію охолоджували до кімнатної Т і вводили у центрифугу з фактором розділення 80. Через 45 хвилин процес завершували, одержуючи 68,3 г осаду. До 68,3 г осаду додавали 65,7 г (83 мл) ацетону, суміш інтенсивно перемішували при кімнатній Т впродовж 5 хв і вводили у центрифугу з фактором розділення 100. Через 30 хв процес завершували. Осад висушували при Т=30-35 °С, під вакуумом, потім просіювали через сито з діаметром отворів 1 мм і одержували 56,74 г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт перегоняли на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержували 41,7 г залишку, що утримував тригліцериди, жирні кислоти та сліди вологи. Загальні витрати ацетону становили 959,7 г (1214 мл).

За наведеними прикладами спостерігали, що час розділення фаз був майже у 1,5 рази меншим, ніж з прототипом.

Запропоноване вирішення задачі відповідає умові "промислова придатність", оскільки відповідає нормам сучасних стандартів, перевершує досягнення об'єктів минулого покоління, стаючи корисним у виробництві продуктів у харчовій, олійно-жировій, комбікормовій, медичній, фармацевтичній або біохімічній промисловості, за використанням засобів, що стали відомі з рівня техніки й поєднані з вирішенням поставленої задачі за подією пріоритету.

Обсяг технічного рішення, що затребуваний заявником і зазначений у Формулі, визначає відмінність від прототипу й допускає набуття ним правового статусу як корисної моделі процесу.

Технічні характеристики процесу у порівнянні з прототипом

Таблиця

Найменування показників	Прототип (сировина Запорізького ОЕЗ)	Запропоноване технічне рішення
Зовнішній вигляд	Сипуча порошкоподібна маса без сторонніх включень	
Запах та смак	Без запаху, безсмачний	
Колір	Жовтувато-коричневий	
Масова частка вологи, %	1,2	1,2
Масова частка олії, %	1,5	1,5
Масова доля речовин, нерозчинних в етиловому ефірі	2,64	0,18
Масова частка фосфоліпідів, %	94,66	97,12
Тривалість фільтрацій, хв/цикл	205	140-145
Продуктивність, кг/ч (при отриманні 10 кг/цикл)	2,94	4,17

Аналоги:

1. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату: Пат. 81822 України, МПК: C07F 9/10, A23J 7/00, A23D 9/00 /Гаманухо В.І., Глух А.І., Глух І.С (Україна); ЗАТ "ДО ІРЕА" (Україна). - № a200600888; заявл. 01.02.06; опубл. 15.10.08.

2. СОУ 15.4-37-212:2004. Концентрати фосфатидні. Технічні умови.

3. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату: Пат.54922 України, МПК A23D 9/00, A23J 7/00 /Шульга С.М., Глух А.І., Глух І.С., Школа О.І. (Україна). - № u201007237; заявл. 11.06.10; опубл. 25.11.10.

4. Промислові центрифуги Україні: http://frunze.com.ua

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, що включає тристадійну обробку фосфатидного концентрату ацетоном і фільтрацію щоразу, де на першій стадії фосфатидний концентрат змішують з ацетоном у співвідношенні мас. частин 1,0:9,25-10,0, відповідно, й виділяють з нього фосфоліпіди, при Т=25-55 °С, на другій - екстрагують олію, вільні жирні кислоти, на третій - промивають фосфоліпіди, переганяють і виводять з процесу ацетоновий екстракт, який **відрізняється** тим, що відокремлення фаз проводять центрифугуванням, з

факторами розділення ≤100, ≤150, ≤200, впродовж 60-65, 40-45 й 30-35 хв, на першій, другій і третій стадіях, відповідно.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

УКРАЇНА

(19) UA (11) 54922 (13) U

(51) МПК (2009)
A23D 9/00
A23J 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під відповідальність власника патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ ІЗ ФОСФАТИДНОГО КОНЦЕНТРАТУ

(21) u201007237
(22) 11.06.2010
(24) 25.11.2010
(46) 25.11.2010, Бюл.№ 22, 2010 р.
(72) ШУЛЬГА СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, ГЛУХ АНДРІЙ ІГОРОВИЧ, ГЛУХ ІГОР СЕМЕНОВИЧ, ШКОЛА ОЛЕГ ІВАНОВИЧ
(73) ШУЛЬГА СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, ГЛУХ АНДРІЙ ІГОРОВИЧ, ГЛУХ ІГОР СЕМЕНОВИЧ, ШКОЛА ОЛЕГ ІВАНОВИЧ

(57) Спосіб виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату, що включає обробку фосфатидного концентрату ацетоном у дві стадії при температурі 25-55 °С з наступними фільтраціями, промивку ацетоном з наступною фільтрацією та промивку фосфоліпідів на третій стадії, який **відрізняється** тим, що на першій стадії олію із фосфатидного концентрату екстрагують ацетоном у співвідношенні олія, яка міститься у фосфатидному концентраті, - ацетон 1:(9,25-10,0) масових часток з наступною фільтрацією.

1

Корисна модель відноситься до олійно-жирової промисловості, зокрема, до виділення лецетину із фосфатидного концентрату і може бути використана в харчовій, медичній, біохімічній та комбікормовій промисловості.

Фосфатидний концентрат (фосфатиди) - залишок олійно-жирової промисловості, який утворюється при гідратації олії.

Відомий спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату [1], який полягає в тому, що фосфатидний концентрат розчиняють у гексані (неполярному розчиннику) у співвідношенні вагових частин 1:1. Одержаний розчин обробляють, з метою відділення фосфоліпідів від жирів та інших супутніх речовин, водою у співвідношенні фосфатидний концентрат до води 1-1,5:1 при інтенсивному перемішуванні. В цих умовах фосфоліпіди гідратуються, втрачають розчинність в гексані і переходять після відстоювання в дрібнодисперсний осад (емульсію), який відокремлюють від гексанового шару. Ущільнення та зневоднення осаду проводять шляхом нагрівання до температури 60-80°С протягом 20-30 хвилин.

Недоліком способу є утворення тяжкозневоднюваного осадку та інактивування лецетину при термічній обробці осаду фосфоліпідів з метою його зневоднення, що робить неможливим застосування лецетину в медичній промисловості в якості біологічно активної добавки в раціоні харчування населення.

2

Відомий також спосіб виділення фосфоліпідів [2] шляхом обробки фосфатидного концентрату ацетоном у співвідношенні фосфатидного концентрату і ацетону 1:2 на початковій стадії, а далі у співвідношенні 1:1, при температурі 50-55°С з наступним охолодженням суміші до кімнатної температури і декантуванням рідинної фази.

Недоліком способу є неможливість одержання лецетину високої чистоти, використовуваного в якості біологічно активної добавки до раціону харчування для профілактики захворювань печінки та жовчного міхура [3], а також в якості емульгатора Е322 [4].

Найбільш близьким за технічною суттю та досягнутим результатам є спосіб [5], виділення фосфоліпідів шляхом обробки фосфатидного концентрату ацетоном при температурі 25-55°С та співвідношенні фосфатидний концентрат:ацетон 1:(3,7-4,0) мас. ч. на першій стадії з наступною фільтрацією, на другій стадії олію та вільні жирні кислоти з виділених фосфоліпідів екстрагують ацетоном у співвідношенні фосфоліпіди : ацетон 1:(5,6-6,6) мас. ч. з наступною фільтрацією, на третій стадії промивають фосфоліпіди ацетоном у співвідношенні фосфоліпіди:ацетон 1:(0,8-0,94) мас. ч. з наступною фільтрацією.

Недоліком способу є неможливість одержання лецетину високої чистоти для використання у харчової, фармацевтичної та кормової промисловості. Останнє пов'язане з різноманітним складом сировини - фосфатидного концентрату, зокрема, з різ-

(19) UA (11) 54922 (13) U

ним вмістом олії. Так, згідно [6], олійно-жирова промисловість виробляє фосфатидний концентрат з наступним вмістом фосфатидів і олії (таблиця 1).

Таблиця 1

Найменування	Харчові			Кормові
Фізико-хімічні показники	СнХ-1, СХ-1, СнВХ-1	СнХ-2, СнВХ-2, СХ-2	СнХ-3, СХ-3	СнК, СК
Масова частка фосфатидів, %, не менше ніж	60,0	55,0	50,0	40,0
Масова частка олії, %, не більше ніж	40,0	45,0	50,0	60,0

Значна кількість домішок в лецитині, отриманого способом [5], з харчових фосфатидних концентратів марок СнХ-2, СнВХ-2, СХ-2, СнХ-3 та СХ-3, пов'язана з неоптимальним співвідношенням фосфатидного концентрату і ацетону в процесі екстракції. В наслідок цього в лецетині, який використовується як кормові добавки по [7], в якості біологічно активної добавки до раціону харчування для профілактики захворювань печінки та жовчного міхура [3], а також в якості емульгатора Е322 [4], отриманий способом [5], міститься до 7,8% домішок тригліцеридів та вільних жирних кислот. При використанні в якості сировини кормових фосфатидних концентратів взагалі неможливо отримати порошкоподібні фосфоліпіди жовто-коричневого кольору в наслідок того, що після першої екстракції фази розділюються, але фосфатиди відділяються у вигляді важкої резиноподібної рідини, що робить неможливим проведення фільтрації, як це описано в прототипі, тобто, найбільш важливе співвідношення сировина - екстрагент на першій стадії екстракції.

Задачею запропонованої корисної моделі є поліпшення фракційного складу лецетину при використанні в якості сировини харчових фосфатидних концентратів марок СнХ-2, СнВХ-2, СХ-2, СнХ-3 та СХ-3, та можливість використання в якості сировини для отримання лецетину кормових фосфатидних концентратів. Використання запропонованого способу дозволяє одержати лецетин без домішок, який відповідає кращим світовим аналогам.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату, який полягає в обробці фосфатидного концентрату ацетоном при температурі 25-55°С на першій стадії з наступною фільтрацією, на другій стадії олію та вільні жирні кислоти з виділених фосфоліпідів екстрагують ацетоном з наступною фільтрацією, на третій стадії промивають фосфоліпіди ацетоном наступною фільтрацією, відповідно до корисної моделі на першій стадії олію із фосфатидного концентрату екстрагують ацетоном у співвідношенні олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:(9,25-10,0) масових часток з послідуючою фільтрацією.

Відсутність домішок у лецетині утворюється за рахунок декількох факторів: екстракція олії із фосфатидного концентрату ацетоном у співвідношенні олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:(9,25-10,0) масових часток приводить до значного (~90%) розчинення олії в ацетоні на першій стадії екстракції, незалежно від марки фосфатидного концентрату (харчовий чи кормовий), тобто принципово співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон, а не співвідношення фосфатидний концентрат - ацетон, як це описується у [5]. Послідуюча фільтрація дозволяє в повному об'ємі відділити ацетоновий розчин тригліцеридів від твердої порошкоподібної фази фосфоліпідів, які після першої стадії містять залишки тригліцеридів та вільні жирні кислоти.

Збільшення на першій стадії екстракції співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон як 1:(9,25-10,0) масових часток веде до значних витрат ацетону та енерговитрат на його регенерацію, зниження цього відношення веде до збільшення вмісту тригліцеридів в твердій фазі при використанні в якості сировини харчових фосфатидних концентратів марок СнХ-2, СнВХ-2, СХ-2, СнХ-3 та СХ-3, що в свою чергу приводить до різкого збільшення часу фільтрації та агломерації часток фосфоліпідів, та робить неможливим процес фільтрації в аналогічних умовах при використанні в якості сировини кормових фосфатидних концентратів.

Суть запропонованого способу полягає у визначенні технологічних параметрів процесу знежирення фосфатидного концентрату шляхом його екстрагування ацетоном.

Спосіб реалізується наступним чином:

Приклад 1

До 100г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (вміст фосфатидів 60%) додають 370г (468мл) ацетону (співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:9,25 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 74,94г осаду. До 74,94г осаду додають 420г (532мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:5,6 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Потім суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 70г осаду. До 70г осаду додають 56г (71мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:0,8 масових часток), суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хвилин і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при температурі 30-35°С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1 мм і одер-

жують 58,32г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 41,68г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 846г (1071мл).

Приклад 2

До 100г фосфатидного концентрату марки СХ-1 (вміст фосфатидів 60%) додають 400г (506мл) ацетону (співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:10 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 74,86г осаду. До 74,86г осаду додають 494г (625мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:6,6 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Потім суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 69,86г осаду. До 69,86г осаду додають 65,7г (83мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:0,94 масових часток), суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хвилин і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при температурі 30-35°С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1мм і одержують 58,3г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 41,7г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 959,7г (1214мл).

Приклад 3

До 100г фосфатидного концентрату марки СнК (вміст фосфатидів 40%) додають 555г (703мл) ацетону (співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:9,25 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 49,96г осаду. До 49,96г осаду додають 280г (354мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:5,6 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Потім суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 46,7г осаду. До 46,7г осаду додають 37,4г (47,3мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:0,8 масових часток), суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хвилин і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при температурі 30-35°С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1мм і одержують 38,9г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 61,1г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 872,4г (1104,3мл).

Приклад 4

До 100г фосфатидного концентрату марки СХ-3 (вміст фосфатидів 50%) додають 462,5г (585мл) ацетону (співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:9,25 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 62,45г осаду. До 62,45г осаду додають 350г (443мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:5,6 масових часток), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Потім суспензію охолоджують до кімнатної температури і фільтрують. Одержують 58,3г осаду. До 58,3г осаду додають 46,6г (59мл) ацетону (співвідношення осад - ацетон 1:0,8 масових часток), суміш інтенсивно перемішують при кімнатній температурі 5 хвилин і фільтрують. Осад висушують під вакуумом при температурі 30-35°С, потім просіюють через сито з діаметром отворів 1мм і одержують 48,6г порошкоподібних фосфоліпідів жовто-коричневого кольору.

Ацетоновий екстракт переганяють на лабораторній перегінній установці. Після відгонки ацетону одержують 51,4г залишку, що містить тригліцериди, жирні кислоти, сліди вологи. Загальні витрати ацетону складають 859г (1087мл).

Приклад 5

До 100г фосфатидного концентрату марки СнК (вміст фосфатидів 40%) додають 370г (468мл) ацетону (співвідношення олія, яка міститься у фосфатидному концентраті - ацетон 1:6,17 масових часток, тобто співвідношення фосфатидний концентрат - ацетон 1:3,7 масових часток (приклад 1 прототипу)), суміш нагрівають до температури 45°С і інтенсивно перемішують 5 хвилин. Після охолодження до кімнатної температури суміш поділилася на дві фази, але відфільтрувати розчин тригліцеридів та вільних жирних кислот від ризиноподібного осаду в умовах, аналогічних прикладам 1 - 4 не вдалося.

Фракційний склад отриманих фосфоліпідів наведено в таблиці 2.

-

№ п/п	Назва фракції	Вміст в %			
		Приклади			
		1	2	3	4
1	Фосфоліпіди (лецитин)	99,97	99,99	99,97	99,97
2	Тригліцериди	сліди	-	сліди	сліди
3	Вологість	-	-	-	-
4	Жирні кислоти	0,02	сліди	0,02	0,02

Спосіб реалізований на стандартному обладнанні.

Оптимальними умовами для знежирення фосфатидного концентрату на першій стадії є:

- співвідношення олії, яка міститься у фосфатидному концентраті до ацетону 1:(9,25-10,0) масових часток з послідуючою фільтрацією;

Використання запропонованого способу дозволяє одержати лецетин без домішок, відповідаючий кращім світовим аналогам та використовувати в якості сировини для отримання лецетину кормових фосфатидних концентратів.

Джерела інформації:

1. Патент України № 45451, бюл. № 4, 2002 р.

2. Патент України № 70870, бюл. № 10, 2004 р.

3. Лецетин в профилактике и лечении заболеваний печени и желчного пузыря, Г.А. Анохина, Проблемы питания и здоровья, с. 27-28.

4. Постанова Кабінету Міністрів України № 12 від 04.01.99 р. «Про затвердження переліку харчових добавок, дозволених для використання у харчових продуктах».

5. Патент України № 81822, бюл. № 3, 2008 р.

6. СОУ 15.4-37-212:2004 Концентрати фосфатидні. Технічні умови.

7. ТУУ 15.7-03598943-014:2007 Добавка кормова лецетин.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

1.2. Властивості і застосування сухого знежиреного лецитину

УДК 577.125:665.372

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛЕЦИТИНУ З СОНЯШНИКУ

Шульга С.М., канд. фіз.-мат. наук, с.н.с., Глух І.С., канд. техн. наук, с.н.с.
***Дроздов О.Л., д-р мед. наук, професор, директор**
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, м. Київ
***НДІ медико-біологічних проблем ДУ «ДМА» МОЗ України, м. Дніпропетровськ**

Розглянуто біологічні властивості лецитину з соняшнику. Обговорено два напрямки функціонування лецитину – перший, в якості структурного компонента біологічних мембран і стабілізуючого компонента ферментів та білків; другий, в якості харчової біологічно активної добавки.

Considered biological properties of sunflower lecithin. Discuss two areas of functioning lecithin – first as a structural component of biological membranes and stabilizing component of enzymes and proteins; second, as biologically active additives for food .

Ключові слова: фосфатидилхолін, фосфоліпіди, лецитин, харчова добавка.

У наш час термін лецитин розглядається у двох аспектах: перший, як синонім назви класу фосфоліпідів (ФЛ) – фосфатидилхоліну (-нів); другий, як назва комплексної харчової добавки, отриманої з сосвих бобів, насіння соняшнику, арахісу та інших олійних культур, жовтків яєць, пивних дріжджів, риби тощо.

За хімічною структурою фосфатидилхолін (ФХ) належить до фосфатидів і є похідним sn-гліцеро-3-фосфату (L-α-гліцерофосфату).

У молекулі лецитину фосфатна та холінова групи утворюють полярну (заряджену) головку молекули. При температурі 34-37 °С ФХ (як і інші ліпіди) знаходиться переважно у «твердому» стані, що обумовлює ряд його біологічних функцій, зокрема участь у побудові клітинних мембран [1].

Хімічною особливістю фосфатидилхолінів є те, що первинна спиртова група гліцерину етерифікована фосфорною кислотою, яка поєднана етерним зв'язком з аміноспиртом холіном. Дана група фосфоліпідів містить жирні кислоти (ЖК), при цьому насичені ЖК (зокрема, пальмітинова, стеаринова) хімічно зв'язані з α-вуглецевим атомом, а ненасичені (олеїнова, ліноленова) – з β-вуглецевим атомом.

Метаболічною особливістю фосфатидилхоліну, як і всього класу фосфоліпідів, є висока швидкість біоперетворень.

Основною біологічною функцією ФХ є участь в утворенні та функціонуванні клітинних мембран. До складу клітинних (цитоплазматичних) мембран входять, в першу чергу, білки та ліпіди (типове вагове співвідношення між ними становить 1:1), вуглеводи (до 5 %) та невелика кількість РНК (менше ніж 0,1 %). Наявність ліпідів визначає такі властивості біологічних мембран, як високий опір (близько 10^3 Ом·см

^{2}), велика електрична ємність (0,5-1,5 мкФ·см$^{-2}$), непроникність для іонів та інших полярних з'єднань, проникність для неполярних з'єднань [2].

На основі вивчення фізико-хімічних властивостей ліпідів була запропонована модель мембрани у вигляді ліпідного бішару (рис. 1).

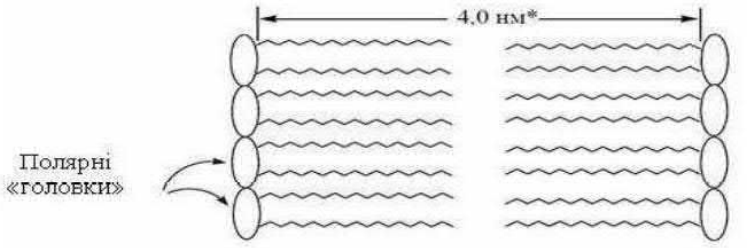


Рис. 1 – Модель мембрани у вигляді ліпідного бішару

У даному подвійному шарі вуглеводні ланцюги ліпідів розташовуються один біля іншого у витягнутому стані, а полярні групи фосфоліпідів взаємодіють з білковими молекулами, які розташовані по обидва боки від ліпідного бішару. Ця модель потім була використана як базова для розробки наступних, більш складних уявлень про структуру та функціонування біологічних мембран.

Визначення складу ліпідів різних мембран показало [1] значний вміст у них холестерину, гліколіпідів та, особливо, фосфоліпідів. Мембранні фосфоліпіди представлені, в першу чергу, фосфатидилхоліном (ФХ), фосфатидилетаноламіном (ФЕ), фосфатидилсерином (ФС), дифосфатидилгліцерином (кардіоліпіном), сфінгоміеліном та в невеликих кількостях фосфатидилінозитолом (ФІ).

ФХ є головною складовою частиною мембрани та знаходиться на її зовнішній поверхні, тоді як ФЕ переважає на внутрішній стороні плазматичної мембрани. ФС, що є важливою складовою частиною мембрани, також локалізується на її внутрішній поверхні. Переважання ФЕ та ФС на внутрішній поверхні мембран призводить до того, що на ній локалізується більша частина реакційноспроможних аміногруп, здатних приєднувати білки. Сфінгоміелін у великих кількостях міститься в мембранах, які виконують, переважно, функцію підтримки морфологічної структури тканин та утворень. ФІ, хоча відноситься до другорядних (за кількістю) компонентів клітинних мембран, відіграє суттєву роль, зокрема в регулюванні внутрішньоклітинного вмісту іонів кальцію.

Одним з актуальних питань є розшифрування конкретної участі ФХ у здійсненні функцій цитоплазматичних мембран, в першу чергу, в переносі крізь них речовин з різною хімічною будовою та фізико-хімічними властивостями [3].

Встановлено, що безпосередній вплив на ці процеси має фізико-хімічний стан ліпідного бішару. Так, його внутрішня частина знаходиться в більш рідкому стані, ніж зовнішня, що суттєво полегшує переміщення речовин у подібних умовах. Частково, вказана особливість пояснюється розташуванням ненасичених зв'язків, що обумовлюють плинність жирів, в основному, починаючи з С9-С10 вуглеводних фрагментів. Винятком з даного правила є арахідонова ($C_{20:4}$) жирна кислота, в якій ненасичені зв'язки знаходяться в позиціях С4-С5, С8-С9, С11-С12 та С14-С15, тоді як в ліноленовій ($C_{18:3}$) кислоті вони розташовуються в С9-С10, С12-С13 та С15-С16 положеннях. Можливо, що така, більш близька до полярної голівки, локалізація подвійних зв'язків в арахідоновій кислоті визначає її особливу біологічну роль.

Іншою особливістю фізико-хімічних властивостей ФЛ, включаючи фосфатидилхоліни є здатність жирних кислот «плавитися» (переходити в більш рідкий стан) при температурах близьких або таких, що перевищують температуру переходу (T_t) або «плавлення». Цей показник залежить від жирнокислотного складу фосфоліпідів, наявність у них ненасичених жирних кислот із довжиною вуглеводневого ланцюгу характерна для високих значень T_t, за яких ліпіди знаходяться у стані, що наближується до «твердого». В організмі людини така картина спостерігається в міелінових мембранах. «Плавлення» ліпідів при температур, які наближуються до T_t, полегшує обертання та закручування молекул, при зберіганні структури бішару.

Достатньо відомим фактом є те, що поверхня клітинних мембран постійно здійснює хвилеподібні рухи. Рухомість мембранних ліпідів, що обумовлена та пов'язана з їх фізико-хімічними властивостями, необхідна для реалізації такої фундаментальної функції ФЛ, як трансмембранний транспорт речовин. Біологічні мембрани мають достатньо високу проникність для нейтральних (неполярних, незаряджених) молекул, наприклад H_2O. При температурах близьких до T_t або таких, що перевищують T_t, ланцюги жирних кислот можуть обертатися на 120°, при цьому переходять з транс- у скошену (гош-) конфігурацію, утворюючи «злами», а на поверхні бішару «кишені», в які проникають малі та/або середні молекули. У

зв'язку з тим, що «злами» порівняно легко переміщуються по ліпідному бішару, забезпечується проникнення речовин крізь мембрану. Аналогічним способом може здійснюватись переміщення більш великих молекул, які самі відіграють роль транспортних засобів у мембранному транспорті.

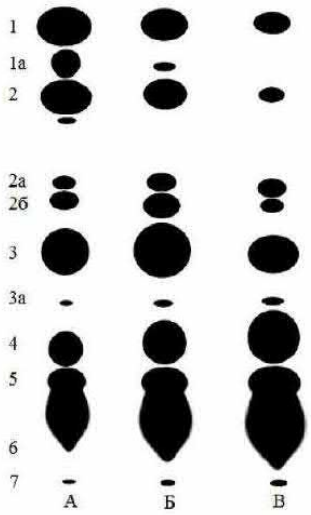
На відміну від ФХ, лецитин як харчовий продукт є сумішшю звичайних фосфоліпідів, вільних жирних кислот та «мінорних» («що рідко зустрічаються») фосфоліпідів, наприклад лізофосфатидилхоліну, а також ряду домішок, склад яких визначається джерелом отримання продукту. Використання подібних сумішей, з одного боку, змушує постійно шукати способи їх додаткового очищення, з іншого – враховувати в процесі застосування особливості складу сировини, що використовується для їх отримання та надає лецитину додаткові біологічні властивості [4, 5].

Для отримання лецитину у вигляді харчової добавки олію, що віджимають з насіння олійних культур (соняшнику, арахісу, кукурудзи та ін.) або бобів сої, обробляють «гострою» парою та з подальшому очищують з утворенням «сирого» лецитину. Подальше знежирення «сирого» лецитину призводить до отримання чистого лецитину, що являє собою сипкий порошок із вмістом фосфоліпідів 90-96 %. Наступне виділення ФХ потребує додаткового використання екстракційних методів та препаративної хроматографії.

Істотне значення має сировина, з якої отримують «чистий» лецитин. Сьогодні найбільш розповсюджене використання соєвого лецитину, що обумовлено більш легким та розповсюдженим обробленням сої, особливо в США, та ефективним її переробленням з отриманням широкого асортименту соєвих продуктів: «масла», «м'яса», «молока», добавок до харчових продуктів тощо. Разом з тим, соєві боби містять ряд речовин, що негативно впливають на організм ссавців, включаючи й людину. До їх числа належать інгібітори трипсину, олігосахариди, аглютиніни, що підвищують здатність згущувати кров, гойтрогени, що порушують функції щитовидної залози та ін. Інактивація подібних речовин з основному потребує інтенсифікації та подовження дії на рослинну сировину високих температур, що призводить до руйнування ненасичених зв'язків молекул.

Останнім часом, велику увагу приділяють соняшниковому лецитину. Це обумовлено тим, що вміст фосфоліпідів у насінні соняшнику практично не відрізняється від бобів сої, їх виділення потребує менш тривалого температурного оброблення і в них міститься більше поліненасичених жирних кислот [6].

Порівняльний хроматографічний аналіз ліпідів соєвого та соняшникового лецитину, схематичне зображення результатів якого наведено на рис. 2, показує, що вони містять практично однакові компоненти [7].



*А – **Topcithin 100**, отриманий із сої; Б – **Eptkuron 100P**, отриманий із сої, обидві харчові добавки виробництва фірми **Lucas Meyer** (Німеччина); В – соняшниковий лецитин виробництва «Дніпротехнологія» (Україна); 1 – тригліцериди; 2 – вільні жирні кислоти; 3 – фосфатидилетаноламін; 5 – фосфатидилхолін; 6 – фосфатидилінозит; 7 – лізофосфатидилхолін; 1а, 2а, 2б, 3а – неідентифіковані компоненти*

Рис.2 – Хроматографічний аналіз лецитинів із сої та соняшнику

Детальні відомості про склад соняшникового лецитину були наведені в роботі [8]. У складі лецитину з соняшнику 96,5 % фосфоліпідів, з них ФХ – (26,8-28,2) %, ФЕ – (24,3-25,2) %, ФІ – (14,2-15,0) %, ФС –

(13,0-14,0) %, фосфатидилгліцерола – (3,9-4,3) %, дифосфатидилгліцеролу – (6,3-6,9) %, лізофосфатидилхоліна – (0,3-0,4) %, лізофосфатидилетаноламіну – (0,2-0,3) %, фосфатидних кислот – (7,3-7,5) %. У жирнокислотному складі лецитину домінує лінолева (С 18:2) кислота (59,1-61,8) %, при цьому її ω-6 форма складає 60,2 %, а ω-4 – (0,2-1,6) %. Крім неї в лецитині містяться пальмітинова (15,8-19,1%), олеїнова (10,3-12,5%), стеаринова (5,5-6,1%), бегенова (1,2-1,7%), ліноленова ω-3 (0,4-0,6%), арахісова (0,4-0,6%), арахідонова (0,2-0,7%) та ін. жирні кислоти. Разом з тим, споживчі та біологічні властивості у лецитину з сої та соняшнику, як у харчової добавки, практично однакові [9, 10].

Споживчою властивістю лецитину є те, що він має емульгувальні властивості, що дозволяє віднести його до природних харчових добавок (Е 322), до підкласу емульгаторів, антиоксидантів. Це дозволяє використовувати лецитин при виготовленні маргарину, при випіканні хліба та інших хлібобулочних виробів для підвищення їх якості (питомого об'єму, формостійкості, пористості, еластичності, уповільнення черствіння та ін.). Вивчення впливу на якість хліба з лецитину із соняшнику показало, що його додавання в об'ємах (0,3-0,5) % маси борошна приводило до покращення як органолептичних, так і фізико-хімічних властивостей продукту (збільшення об'ємного виходу, більш світлий колір м'якуша, більш розвинута рівномірна пористість хліба, підвищення пружності та еластичності тіста) [9, 10].

Регулярне застосування лецитину протягом півтора-двох та більше місяців викликало суттєву зміну функціонування печінки. Це проявлялось у зменшенні згущення жовчі, зниженні вмісту в ній кристалів холестерину, білірубінату кальцію, жовчних солей, мікролітів, покращенні її колоїдної стабільності, підвищенні міцелоутворення, зменшенні явищ жирової інфільтрації. Крім описаних гепатопротекторних властивостей, харчова добавка – лецитин, як постачальник основних класів фосфоліпідів, при прийомі натщесерце проявляє жовчогінну дію, сприяє скороченню жовчного міхура та жовчовивідних шляхів, а також перистальтиці кишківника [11, 12, 13].

Ще однією властивістю лецитину, тісно пов'язаною з гепатотропним ефектом, є його вплив на показники ліпідного обміну.

У зв'язку з тим, що в організмі ссавців, включаючи людину, транспорт ліпідів здійснюється у водному середовищі, вони утворюють складні шаровидної (псевдоміцелярної) форми структури, які включають молекули білків – аполіпротеїнів. У цих структурах фосфоліпіди, неетерифікований холестерин та аполіпротеїни розташовані у зовнішніх шарах, тоді як тригліцериди та етерифікований холестерин – у внутрішніх.

В основі дії лецитину на метаболізм жирів лежить природний антагонізм фосфатидилхоліну (інших фосфоліпідів) та холестерину. Вже на рівні цитоплазматичних мембран проявляється здатність холестерину підвищувати їх жорсткість та збільшувати твердість, тоді як ФЛ, включаючи ФХ, роблять їх більш текучими та рідкими, тобто збільшують функціональну активність мембран. Регулярне застосування лецитину приводить до зниження рівня холестерину в крові та стінках кровоносних судин, а також підвищує здатність жовчних кислот виводити цю сполуку з кровотоку.

Ще однією суттєвою властивість лецитину є його участь у вемоктуванні жиророзчинних вітамінів А, D, Е та К, а також в їх біологічній трансформації, як і вітамінів групи В, з утворенням метаболічно активних форм.

Суттєвим біологічним ефектом лецитину є його нейротропна дія, яка проявляється в зниженні, на фоні регуляторного використання цієї харчової добавки, роздратування, втомлюваності, покращенні показників уваги, навчальності та пам'яті. При постійному вживанні після перенесеного інсульту лецитин сприяє більш повному відновленню психічних та рухових функцій.

Фосфатидилхолін є донором аміноспирту холіну в синтезі нейромедіатору ацетилхоліну, що каталізується ацетилхолінтранеферазою.

Ряд компонентів, що входять до складу харчового лецитину (фосфатидилінозитол, діацилгліцерол або фосфатидилсерин), мають здатність регулювати активність внутріклітинних Ca^{+2} – залежних протеїнкіназ та брали участь у протіканні каскадних механізмів, що змінюють рівень фосфорилювання білків та ліпідів, зокрема в нейронах.

У наш час застосування лецитину як харчової добавки до базисної терапії рекомендується при доволі широкому колі захворювань.

Література

1. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. – М.: Наука, 1991. – 136 с.
2. Генис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
3. Hulbert A.J. Life, death and membrane bilayers // J. Experimental Biol. – 2003. – 206. – P. 2303-2311.
4. Szuhai B. Lecithin //Baileys Oils & Fats. Chapt. 13 – 2001. – Vol. 3. – P. 361-456.

5. Nieuwenhuyzen W., Tomas M. Update of vegetable lecithin and phospholipid technologies // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2008. – 110. – P. 472-486.
6. Микитюк В.В., Глух І.С., Шульга С.М. Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва – К.: Освіта України, 2010. – 114 с.
7. Шульга С.М., Глух А.І., Глух І.С., Дроздов О.Л., Школа О.І. Використання сухого соняшникового лецитину при виробництві хлібобулочних виробів та маргаринів // Тем. зб. наукових праць Донец. нац. ун-т економіки і торгівлі. – 2012. – Вип. 28. – С. 169-174.
8. Shulga S., Glukh I. Technology of dry powder sunflower lecithin for food, feed and pharmaceutics // Presentation at 103 AOCS Annual Meeting, Long Beach, USA. – 2012.
9. Шульга С.М., Глух И.С., Гаманухо В.И., Школа О.И, Терещенко С.И. Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин» // Матеріали науково-практичної конференції «Харчові добавки, інгредієнти, БАДИ: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв». – К.: Знання. – 2003. – С.68-70.
10. Глух И.С., Школа О.И., Ключкова В.Е., Шульга С.М., Гаманухо В.И. Аспекты применения подсолнечного лецитина в пищевой промышленности // Наукові праці ОНАХТ. – 2009. – Вип. 36, Т. 2. – С. 177-179.
11. Teilor L., Arends J., Hodina A., Unger C., Massing U. Plasma lyso-phosphatidylholine concentration is decreased in cancer patients // Lipids in health and Disease. – 2007. – 6, 17 – P. 1-8.
12. Mourelle M., Guarner F., Malagelada J. Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents structure formation in a rat model of colitis // Gastroenterology. – 1996. – 110. – P. 1093-1097.
13. Wang ZN. Et al. Gut-flora-dependent metabolism of dietary PC and atherosclerosis // Nature. – 2011. – 472. – P. 67-63.

УДК 664.66.022.39

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНОГО ПОЛИСАХАРИДА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СВОЙСТВ МУКИ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ КЛЯРА

Куданович Л.А., студентка 5 курса, Клюкина О.Н., канд. техн. наук, ст. преподаватель, Птичкина Н.М., д-р хим. наук, профессор
«Саратовский аграрный университет им. Н.И. Вавилова», г. Саратов

С целью улучшения свойств теста была исследована целесообразность введения полисахарида и изучено влияние вносимого микробного полисахарида на свойства муки, и на вязкость кляра. Была проведена органолептическая оценка готовых изделий. Определили оптимальную концентрацию микробного полисахарида.

Expediency of the polysaccharide in order to improve the properties of the dough was investigated. Effects of microbial polysaccharide additives on the flour properties, and viscosity of liquid dough was studied. Organoleptic evaluation of finished products was performed. optimum concentration of the microbial polysaccharide has been identified.

Ключевые слова: микробный полисахарид, жидкое тесто, кляр.

Актуальность исследуемой темы. На предприятиях общественного питания широко распространены блюда жареные в кляре во фритюре. В кляре жарят разнообразные продукты: мясо и субпродукты, рыбу и морепродукты, овощи, фрукты, творог и мороженное. При приготовлении кляра используют взбитые белки, которые быстро опадают, и поэтому их необходимо стабилизировать.

Целью исследования является разработка жидкого теста (кляра) со стабилизированными белками муки и яиц полисахаридом (ПС) микробного происхождения.

Результаты исследования. С помощью прибора миксолаб измеряли влияние ПС на реологические свойства теста.

Миксолаб предназначен для контроля динамики реологического поведения теста в процессе замеса по характеру изменения величины крутящего момента на приводе тестомесильной емкости и определения следующих показателей: водопоглотительная способность муки (ВПС), время образования теста, его стабильность и значение разжижения, а также консистенция теста в процессе нагрева. По окончании анализа программа автоматически выдает значения крутящего момента в наиболее характерных точках

УДК 547.953:615.012:665:372 **doi 10.15407/biotech7.01.123**

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОПРЕПАРАТОВ ИЗ ОБЕЗЖИРЕННЫХ ЛЕЦИТИНОВ СОИ И ПОДСОЛНЕЧНИКА

А. Л. Дроздов[1]
С. М. Шульга[2]
М. Адаб[1]
И. С. Глух[2]

[1]НИИ медико-биологических проблем ГУ «ДМА» МОЗ Украины, Днепропетровск
[2]ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: *shulga5@i.ua*

Получено 09.10.2013

Представлены результаты исследований гепатопротекторного действия биопрепаратов из обезжиренных лецитинов сои и подсолнечника в условиях интоксикации экспериментальных животных тетрахлорметаном. Анализ результатов исследований воздействия лецитинов сои и подсолнечника на биохимические и гистологические показатели, измененные в условиях отравления, позволяет сделать вывод, что оба биопрепарата замедляли рост массы печени животных, активность трансаминаз, стимулировали регенерацию печени за счет полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов, восстанавливали балочное и дольчатое строение органа, а также осуществляли контакты между гепатоцитами и венозными сосудами. Они также повышали количество двухъядерных гепатоцитов, что свидетельствует об активации процессов репарации при их введении на фоне интоксикации.

Ключевые слова: лецитины, тетрахлорметан, гепатопротекторы.

В основе генеза многих приобретенных хронических воспалительных заболеваний печени лежат происходящие в организме метаболические нарушения. Причиной этих вторичных процессов является действие экзогенных и эндогенных ксенобиотиков, особенно на фоне патологии печени, нарушений питания и других неблагоприятных факторов.

Патогенез метаболических заболеваний печени многогранен и, следовательно, в выборе лекарственных средств предпочтение следует отдавать препаратам, оказывающим влияние на несколько звеньев обмена веществ. Такие эффекты характерны для группы лекарственных препаратов, объединенных под названием «гепатопротекторы», среди которых наиболее известны эссенциальные фосфолипиды.

Любое повреждение ткани печени начинается с плазматической мембраны и сопровождается нарушением ее защитной, стабилизирующей и транспортной функций [1–3]. Развивающиеся и прогрессирующие персистентные изменения метаболизма приводят к деструкции ткани, что само по себе является триггером латентного патологического процесса и способствует усугублению гепатоцеллюлярного повреждения и жировой дистрофии печени (ЖДП) [4–6].

Патогенез ЖДП и стеатогепатита, развивающийся на фоне метаболических нарушений, до конца не изучен. Основные механизмы его возникновения можно разделить на два этапа: формирование ЖДП и развитие воспалительно-некротических изменений с последующим фиброзом ткани и циррозом печени (ЦП) [7].

Независимо от этиологии в основе стеатогепатита лежит патологическое накопление липидов внутри и вне клеток печени за счет экзогенных механизмов: повышения поступления в печень липидов из кишечника и снабжения предшественниками глицеридов (глюкозы, фруктозы и галактозы), а также активации эндогенных процессов: накопления триглицеридов — основных компонентов гепатоцеллюлярных липидов. Источниками синтеза триглицеридов служат жирные кислоты, глицерофосфат, источниками которого являются глицерол, глюкоза и ацетилкоэнзим А. Повышение концентрации последнего приводит к увеличению синтеза желчных кислот и, соответственно, накоплению жира в печени. При накоплении триглицеридов происходит повышение периферической мобилизации липидов и активности липазы триглице-

ридов, что приводит к усилению процессов свободнорадикального окисления липидов (ПОЛ) с накоплением их продуктов [8, 9]. Нарушение метаболизма липидов в печени вызывает снижение синтеза эссенциальных фосфолипидов и повреждение мембран гепатоцитов и нарушение митохондриального дыхания.

Основная роль эссенциальных фосфолипидов заключается в обеспечении полноценной архитектоники и функционирования двуслойной фосфолипидной структуры плазматических мембран и мембран органелл. Стабилизация биомембран обеспечивает нормализацию процессов транспортировки биологически активных веществ, цитотоксинов, ксенобиотиков, что оказывает детоксицирующее, противовоспалительное и регенерирующее действие [10–13].

Нарушение обменных процессов в печени наблюдается при различных заболеваниях. Вследствие патологических процессов может развиваться острая печеночная недостаточность в результате массивного некроза печеночных клеток, вызванного различными причинами, которая проявляется внезапным тяжелым нарушением функции. Одна из этих причин — отравление гепатотропными ядами, в частности тетрахлорметаном (четыреххлористым углеродом — CCl_4). Источником тетрахлорметана является исключительно деятельность человека, естественным путем он не образуется [5, 6].

В связи с особенностями молекулярных механизмов действия тетрахлорметана на мембраны гепатоцитов изучение механизмов действия яда имеет значение для создания модели молекулярной патологии мембранных структур [14, 15]. При этом для коррекции обменных процессов используют различные лекарственные препараты, способствующие стабилизации клеточных мембран и снижению процессов ПОЛ.

Нами был проведен сравнительный хроматографический анализ состава липидов сухого обезжиренного лецитина сои и сухого обезжиренного лецитина подсолнечника, представленный на рис. 1 [16,17].

Как следует из хроматограмм, образцы лецитина сои содержат большее количество триглицеридов, свободных жирных кислот и фосфатидилэтаноламина, однако меньшее количество фосфатидных кислот и фосфатидилхолина, чем лецитин подсолнечника.

В сухом обезжиренном лецитине подсолнечника украинского производства содержится до 98% фосфолипидов, из них фосфатидилхолина — 34%, в жирнокислотном составе доминирует линолевая ($C_{18:2}$) кислота — 62%, при этом ее ω_6-форма составляет 60%.

Кроме нее в лецитине содержатся пальмитиновая (19%), олеиновая (12%), стеариновая (6%), бегеновая (1,7%), линоленовая ω_3 (0,6%) и другие жирные кислоты. Вместе с тем биологические свойства у сухих обезжиренных лецитинов подсолнечника и сои, как у биологически активной пищевой добавки, практически одинаковы.

В ряде работ приводятся результаты использования лецитинов для снижения интоксикации в условиях применения гепатотропных ядов [10, 16–19].

При отравлении гепатотропными ядами фосфатидилхолин лецитина включается непосредственно в фосфолипидную структуру мембран клеток печени, замещает дефекты, восстанавливает барьерную функцию липидного бислоя и оказывает стабилизирующее действие на мембранные протеины [4, 20].

В литературе отсутствуют данные о влиянии сухого обезжиренного лецитина, выделенного из различного растительного сырья, на биохимические и морфологические показатели ткани печени. В связи с этим целью работы было исследование энзиматической

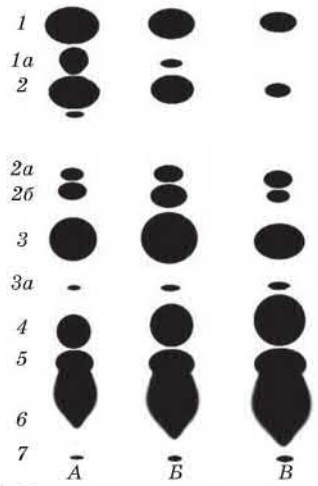


Рис. 1. **Результаты хроматографического анализа лецитинов сои и подсолнечника:**
А — Topcithin 100, полученный из сои;
Б — Eptkuron 100 P, полученный из сои, обе пищевые добавки производства фирмы Lucas Meyer (Германия);
В — подсолнечниковый лецитин украинского производства;
1 — триглицериды; *2* — свободные жирные кислоты; *3* — фосфатидилэтаноламин; *4* — фосфатидная кислота; *5* — фосфатидилхолин; *6* — фосфатидилинозит; *7* — лизофосфатидилхолин; *1а, 2а, 2б, 3а* — неидентифицированные компоненты

активности и гистологических параметров в печени у экспериментальных животных при использовании сухих обезжиренных лецитинов сои и подсолнечника в условиях интоксикации тетрахлорметаном.

Материалы и методы

Сравнительные характеристики эффектов лецитинов сои и подсолнечника в условиях интоксикации изучали на 90 половозрелых крысах Wistar массой 170–200 г. Животные находились в виварии при температуре воздуха 20–24 °С, влажности не более 65% , в режиме «день — ночь», в металлических клетках достаточного размера, на стандартном рационе вивария и получали питьевую воду и корм *ad libitum*. Эксперименты выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренных I–IV Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 2001–2011 гг.) и согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», Страсбург, 1985 [21]. Протокол опытов был согласован Комиссией по биоэтике НИИ медико-биологических проблем ГУ «ДМА» МЗ Украины.

Методом случайной выборки животные были разделены на 4 группы:

- первая — интактная группа животных, которые содержались в стандартных условиях вивария (контроль);
- вторая — животным внутрижелудочно вводили тетрахлорметан;
- третья — внутрижелудочно тетрахлорметан + лецитин сои;
- четвертая — внутрижелудочно тетрахлорметан + лецитин подсолнечника.

Животных декапитировали на 3-и, 7-е, 14-е сут и в сыворотке крови определяли биохимические показатели липидного обмена, активность энзимов и цитохимические показатели. В указанные сроки для изучения морфологических изменений после декапитации животных у них извлекали печень.

В экспериментах использовали тетрахлорметан, ч. д. а., ГОСТ 20288-74, производство АО «Реахим» (Россия), лецитин подсолнечника обезжиренный пищевой (SFL), производство ПАО «ДОИРЕА» (Украина), и лецитин сои обезжиренный пищевой (SL), SOLEC, производство SOLAE LLC (США).

Интоксикацию печени создавали внутрижелудочным введением 50%-го раствора тетрахлорметана в оливковом масле, в дозе 2,5 г/кг, исследуемые показатели определяли на 1-е, 3-и и 7-е сут наблюдений в контрольной группе и группах интоксицированных животных, которым ежедневно внутрижелудочно вводили 20%-ю суспензию SL или SFL в дозе 10,0 г/кг. Животным контрольной группы ежедневно внутрижелудочно вводили изотонический раствор хлористого натрия в дозе 10,0 г/кг.

Функцию печени оценивали по активности аланин- (АлТ; КФ 2.6.1.2.), аспарагинаминотрансферазы (АсТ; КФ 2.6.1.1.) и щелочной фосфатазы (ЩФ; КФ 3.1.3.1.) в сыворотке крови. Ее получали путем центрифугирования образцов согласно методике, используемой в работе [22]. Активность энзимов определяли с помощью спектрофотометра СФ-46, «ЛОМО» (Россия) по стандартным методикам [23].

Для выявления гистологических изменений была изучена микроскопическая структура ткани печени с использованием микроскопа Laboval 4 (ГДР), проведен подсчет объема ядер и количества двуядерных гепатоцитов [24]. Исследуемые органы фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, проводку осуществляли по общепринятой методике с последующей заливкой в парафин [25]. Приготовленные с помощью санного микротома МС-2, «Прапор» (Украина), срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. С помощью окулярмикрометра МК-15, «ЛОМО» (Россия), в препаратах подсчитывали количество двуядерных гепатоцитов в 20 полях зрения и объем ядер [26].

Достоверность различий между исследуемыми группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие величине ошибки $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние интоксикации тетрахлорметаном на макроскопические характеристики ткани печени после трехэтапного введения гепатотоксина на 14-е сут эксперимента представлены в табл. 1. Видны достоверные изменения в печени после интоксикации.

Отмечено увеличение массы печени животных, что проявлялось в диффузном утолщении и, что особенно важно, в наличии очагов некроза.

Изучение динамики изменения массы печени показало, что после трехкратного введения тетрахлорметана увеличение показателя на 7-е и 14-е сут наблюдений по сравнению с исходными значениями достигало 14,8% ($P < 0,05$) и 44,4% ($P < 0,05$), соответственно (табл. 2).

Таблица 1. **Влияние интоксикации тетрахлорметаном на макроскопические характеристики печени крыс**

Макроскопические показатели	Серии экспериментов	
	Контроль ($M \pm m$)	14 сут после первого введения тетрахлорметана ($M \pm m$)
Масса, г	5,4 ± 0,1	7,8 ± 0,8*
Цвет	Красно-вишневый	Ярко-красный, коричневый
Состояние капсулы органа	Плотная, гладкая, блестящая	Плотная, дуффузно утолщенная, блестящая
Наличие патологических очагов	Отсутствуют	Присутствуют очаги некроза

Примечание. Здесь и далее * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. **Влияние лецитинов сои и подсолнечника на массу печени (г) в условиях интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$)**

Серии экспериментов	Сроки наблюдений			
	Контроль (исходный уровень)	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Тетрахлорметан	5,4±0,1	5,8±0,2	6,2± 0,1*	7,8± 0,8*
Тетрахлорметан + SL	5,4±0,1	6,3±0,1*	6,0± 0,1*	6,0± 0,1* *
Тетрахлорметан + SFL	5,4±0,1	6,5±0,6	6,0± 0,1*	5,8± 0,1** •

Примечание. Здесь и далее: ** — $P < 0,05$ по сравнению с интоксикацией тетрахлорметаном; • — $P < 0,05$ по сравнению с SL.

На 3-и сут после введения SL масса печени возрастала на 16,7% по сравнению с контролем, а на 7-е сут — на 11,1% ($P < 0,05$), что сопоставимо с показателем, установленным при введении одного токсина. Дальнейшего роста массы печени не наблюдали. На 14-е сут она была достоверно меньше (на 23,1%), чем при введении одного тетрахлорметана.

Сходный эффект отмечен и в случае применения SFL. При этом также наблюдался ускоренный прирост массы печени на ранних этапах интоксикациии и его существенное замедление при завершении эксперимента.

В условиях интоксикации тетрахлорметаном активность АлТ существенно возрастала на всех этапах наблюдений: на 324,1, 72,2 и 146,1 % соответственно (табл. 3).

Введение лецитина сои достоверно снижало активность АлТ (на 80,0%, 24,0% и 55,0%, на 3-и, 7-е и 14-е сут наблюдений, соответственно), т. е. практически до контрольных величин.

Обращает на себя внимание тот факт, что в ранние сроки исследований активность АлТ на фоне действия SFL была на 28,3 ($P < 0,05$) и 26,6% ($P < 0,05$) выше, чем при введении SL, т. е. на первых этапах наблюдений гепатопротекторная активность SFL была ниже, чем у SL. Однако к концу наблюдений оба лецитина в равной степени нормализовали активность АлТ.

В условиях интоксикации тетрахлорметаном отмечали увеличение активности АсТ (табл. 4), достоверно превышающее контрольные показатели на 3-и, 7-е и 14-е сут на 120,0, 81,0 и 112,9%, соответственно.

При этом возрастание активности АлТ было выше, чем АсТ, что соответствовало степени токсического поражения печени.

В наших экспериментах на 3-и и 14-е сут лецитин сои снижал активность АсТ на 55,9 и 26,9%, соответственно, по сравнению с введением одного тетрахлорметана, т. е. практически до контрольных значений (табл. 4).

Лецитин подсолнечника достоверно уменьшал активность АсТ на 47,3% на 3-и сут эксперимента по сравнению с введением одного тетрахлорметана.

При интоксикации печени тетрахлорметаном при изменении биохимических показателей изменялась и ее микроскопическая структура.

Гистологические исследования срезов печени показали, что у интактных животных структура паренхимы была типичной для нормального органа. Снаружи она покрыта тонкой соединительнотканной капсулой, от которой внутрь органа отходили перегородки, разделяющие его на дольки. Для паренхимы было характерным радиальное расположение трабекул гепатоцитов вокруг центральных сосудов. Границы портальных

Таблица 3. **Изменение активности АлТ (Е/л) при введении лецитина сои и подсолнечника в условиях интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$)**

Серии экспериментов (к-во животных)	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	98,80±3,13	68,25±0,71	99,33±3,02
Тетрахлорметан	419,00±79,00 *	117,50±6,73 *	244,50±57,76*
Тетрахлорметан + SL	84,00±3,53* *	89,50±2,92 * *	110,25±4,85**
Тетрахлорметан + SFL	126,75±14,13** ●	113,33±5,70* ●	108,67±5,50**

Таблица 4. **Влияние лецитинов сои и подсолнечника на активность АсТ (Е/л) в условиях интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$)**

Серии экспериментов (к-во животных)	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	392,00±23,18	255,75±26,14	214,00±11,68
Тетрахлорметан	862,67±96,00 *	463,00±73,14 *	455,60±18,57*
Тетрахлорметан + SL	380,33±25,86**	303,00±32,74**	332,88±17,12 * *
Тетрахлорметан + SFL	454,33±27,56**	377,33±16,55*	407,33±20,60* ●

сосудов и желчных протоков четко обозначены. В ткани печени преобладали одноядерные гепатоциты, реже встречались двухъядерные клетки (рис. 2).

Через 3-е сут после введения тетрахлорметана наблюдались потеря балочной структуры и протеиновая дистрофия паренхимы (рис. 3), увеличение массы тела животных и печени.

При патологическом процессе в результате гибели части клеток в печени происходит стимуляция регенерации органа вследствие полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов, что выражалось в увеличении объема ядер (табл. 5).

В интактном состоянии средний объем ядер гепатоцитов составлял 85,3 ± 2,8 мкм^3, что соответствует норме у крыс. При введении тетрахлорметана объем ядер гепатоцитов (ОЯГ) достоверно возрастал, начиная с 3-х сут эксперимента. Увеличение показателя на 3-и сут составляло 17,2, на 7-е — 41,5, на 14-е — 70,6% ($P<0,05$).

Введение обоих лецитинов приводило к достоверному уменьшению данного показателя практически в равной степени на всех этапах наблюдений по сравнению с действием одного тетрахлорметана. Уменьшение на 14-е сут объема ядер гепатоцитов при введении лецитина, вероятно, свидетельствует о снижении степени интоксикации.

Эффективность действия лецитина сои и подсолнечника повышалась на 7-е сут исследований, о чем свидетельствует уменьшение количества вакуолизированных гепатоцитов, однако очаговые кровоизлияния в ткани печени еще сохранялись (рис. 4). Снижение симптомов интоксикации на 7-е сут при введении лецитинов подтверждалось и нормализацией структуры тканевого микрорайона печени (рис. 5).



Рис. 2. **Структура печени крыс контрольной группы.**
Здесь и далее: окраска гематоксилин-эозином, увеличение 40×7

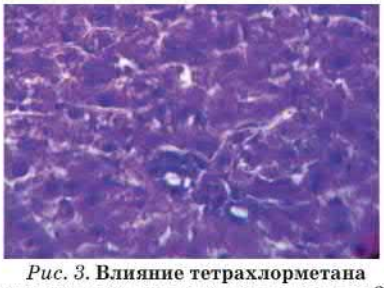


Рис. 3. **Влияние тетрахлорметана на гистологическую структуру печени на 3-и сут интоксикации:**
печень, дистрофия гепатоцитов и их вакуолизация, нарушение балочной структуры

Таблица 5. **Влияние лецитина сои и подсолнечника на объем ядер (мкм^3) гепатоцитов при интоксикации тетрахлорметаном ($M\pm m$)**

Серии экспериментов	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Тетрахлорметан	100,0±0,7	120,7±0,5	145,5±0,7
Тетрахлорметан + SL	80,5±0,5**	75,3±0,4 **	72,3±0,4 **
Тетрахлорметан + SFL	80,8± 0,5**	77,5±0,7 **	75,5±0,5 ** ●

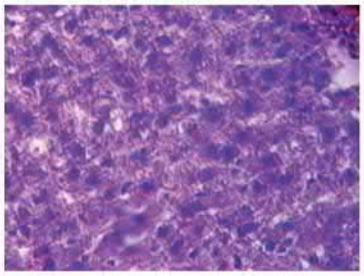


Рис. 4. **Структура печени на 7-е сут интоксикации при введении лецитина подсолнечника:** очаговые кровоизлияния

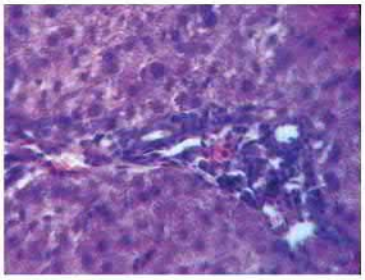


Рис. 5. **Участок ткани печени крыс на 7-е сут интоксикации при введении лецитина сои**

Введение лецитина как подсолнечника, так и сои на фоне интоксикации тетрахлорметаном приводило к уменьшению патологических изменений в печени на 14-е сут эксперимента. У всех животных наблюдалось восстановление балочного и дольчатого строения органа по сравнению с действием одного тетрахлорметана. При этом немногочисленные очаги дистрофии чередовались с участками, содержащими неповрежденные и двуяхъдерные гепатоциты (рис. 6). Это является признаком повышения регенерации печени под действием изученных лецитинов.

Для подтверждения установленных изменений микроскопической структуры печени был проведен подсчет количества двуядерных гепатоцитов, отражающий как повышение нагрузки на печень, так и увеличение в ней интенсивности репаративных процессов.

В контроле этот показатель составлял 9,2±0,6 двухъядерных гепатоцитов в поле зрения. Введение тетрахлорметана приводило к достоверному возрастанию его в среднем на 30% (табл. 6).

Использование лецитина сои или подсолнечника в условиях интоксикации вызывало статистически значимое дополнительное возрастание количества двухъядерных гепатоцитов в среднем на 25–29% на 3-и и 7-е сут и на 36–40% — на 14-е сут после отравления по сравнению с действием одного токсина.

Анализируя результаты исследований воздействия лецитина сои и лецитина подсолнечника на гистологические и биохимические показатели липидного обмена, энзиматической активности у экспериментальных животных в условиях интоксикации тетрахлорметаном можно сделать вывод, что оба лецитина замедляли рост массы печени, снижали прирост активности АлТ и АсТ, стимулировали регенерацию за счет полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов, восстанавливали балочное и дольчатое строение органа, а также контакты между гепатоцитами и венозными сосудами, измененные в условиях отравления. Оба лецитина повышали количество двухъядерных гепатоцитов, что свидетельствует об активации процессов репарации при введении лецитинов сои или подсолнечника в условиях интоксикации. Ранее аналогичные результаты были отмечены при использовании в условиях интоксикации тетрахлорметаном других биологически активных веществ природного происхождения, а также полученных посредством органического синтеза [27–31].



Рис. 6. **Структура печени на 14-е сут после введения лецитина сои:** восстановление балочной структуры

Таблица 6. **Влияние лецитинов сои и подсолнечника на количество двухъядерных гепатоцитов в условиях интоксикации тетрахлорметаном**

Серии экспериментов	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Тетрахлорметан	12,0±0,3	12,2±0,6	12,1±0,4
Тетрахлорметан + SL	15,2±0,6**	15,8±0,6 **	16,5±0,5 **
Тетрахлорметан + SFL	15,5± 0,8**	15,3±0,4 **	17,5±1,3 ** ●

REFERENCES

1. *Vladimirov Yu. A., Archakov A. I.* Lipid Peroxidation in Biological Membranes. *Moscow: Medicine*. 1979, 258 p. (In Russian).
2. *Archakov A. I.* Microsomal Oxidation. *Moscow: Nauka*. 1975, P. 327. (In Russian).
3. *Parke D. V.* The Biochemistry of Foreign Compounds. Transl. from Engl. *Moscow: Medicine*. 1973, P. 288. (In Russian).
4. *Gubskiy Yu. I., Dolgo-Saburov V. B., Khrapak V. V.* Chemical Accidents and Ecology. *Kyiv: Zdorovya*. 1993, P. 224. (In Russian).
5. *Lujnikov E. A.* Clinical Toxicology. *Moscow: Medicine*. 1982, P. 368. (In Russian).
6. *Chernov V. N., Mishkin V. A., Enikeev D. A., Savlukov A. I., Ibatullina R. B.* Oxymethyluracil Influence on Lipid Peroxidation and Functional-Metabolic Parameters in the Liver of Old Rats Intoxication by Carbon Tetrachloride. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2007, N 4, P. 29–30. (In Russian).
7. *Ibatullina R. B., Bakirov A. B.* Liver damage by chemicals. Functional-metabolic disorders, pharmacological correction. *Ufa: Gilem*. 2007, P. 177. (In Russian).
8. *Borodin E. A., Archakov A. I., Lopukhin Yu. M.* Theoretical Justification for the use of Unsaturated Phospholipids to Restore the Structure and Function of Biological Membranes Damaged. *Bulletin of the USSR Academy of Medical Sciences*. 1985, N 3, P. 84–90. (In Russian).
9. *Gordienko A. D.* Pharmacological and biochemical effects of unsaturated phospholipids. *Pharmacology and Toxicology*. 1990, 53(5), 78–81. (In Russian).
10. *Kunts E., Gundermann K. J., Shnaider E.* «Essential» Phospholipids in Hepatology (experimental and clinical experience). *Therapeutic Archives*. 1994, N 2, P. 660–672. (In Russian).
11. *Shulga S., Glukh I., Drozdov O.* Biological Properties of Deoil Sunflower Lecithin/*104th AOCS Annual Meeting, Canada*. April 28–May 1, 2013. – PHO 4: General Phospholipids.
12. *Melnikov K. A., Kobzar M. V.* Characterization and phospholipid composition of sunflower oil. *Bulletin of the National Technical University «KhPI». Kharkiv*. 2005, N 14, P. 99–105. (In Ukrainian).
13. *Shulga S. M., Glukh I. S., Glukh A. I., Drozdov A. L., Shkola O. I.* The development of technology dry lecithin from sunflower phosphatide concentrate. *Science and Innovation*. 2012, 8(5), 62–71. (In Russian).
14. *Dzyak A. V., Shulga S. M., Drozdov A. L., Glukh I. S., Glukh A. I., Ivashchenko T. A.* Comparative characteristics of chromatographic methods for determining the composition of sunflower lecithin: Guidelines. *Dnepropetrovsk*. 2012, P. 70. (In Russian).
15. *Skakun N. P.* Clinical Pharmacology and Essentiale Efficiency in the Liver Diseases. *Exper. and Clinic Pharmacol*. 1993, N 1, P. 69–75. (In Ukrainian).
16. *Konoplya E. N., Prokoshko L. G.* Essenciale as a Modulator with Toxic Liver Damage. *Experm. and Clinic Pharmacol*. 1992, N 6, P. 49–54. (In Russian).
17. *Vengerovskiy A. I., Chuchalin V. S., Pauls O. V., Saratikov A. S.* Effect of gepatoprotektor on the liver lipid metabolism in $CC1_4$-hepatitis. *Bull. Exper. Biol*. 1987, N 4, P. 430–432. (In Russian).
18. *Kumar P. V., Sivaraj A., Elumalai Ek., Kumar B. S.* Carbon tetrachloride-induced hepatotixity in rats — protective of aqueous leaf extracts of *Coccinia grandis. Int. J. PharmTech Res*. 2009, 1(4), P. 1612–1615.
19. *Gubskiy Yu. I.* Correction of Chemical Liver Damage. *Kyiv: Zdorovja*. 1989, 168 p. (In Russian).
20. *Dobrynina O. V., Migulina V. L., Shatinina S. Z., Capitanov A. B.* Reparation mitochondrial membrane of hepatocytes using phosphatidyl choline liposomes. *Bull. Exper. Biol. and Med*. 1991, N 8, P. 135–136. (In Russian).
21. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. *Council of Europe, Strasbourg*, 1986, P. 53.
22. Guide to Laboratory Studies on Biological Chemistry. Ed. T. T. Berezova. *Moscow: Medicine*. 1976, P. 294. (In Russian).

23. *Menshikov V. V., Delektorskaya L. N., Zolotnitskaya R. P., Menshikov V. V.* Laboratory Methods in the Clinic: Handbook. *Moscow: Medicine.* 1987, 368 p. (In Russian).
24. *Blyuger A. F., I. Novitsky N.* Practical Hepatology. *Riga.* 1984, 120 P. (In Russian).
25. *Merkulov G. A.* Treatise patologogistologicheskoy technology. *L.: Medicine.* 1969, 422 P. (In Russian).
26. *Avtandilov G. G.* Medical Morphometry. *Moscow: Medicine.* 1990, 383 P. (In Russian).

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНА ДІЯ БІОПРЕПАРАТІВ ЗІ ЗНЕЖИРЕНИХ ЛЕЦИТИНІВ СОЇ ТА СОНЯШНИКУ

О. Л. Дроздов[1]
С. М. Шульга[2]
М. Адаб[1]
І. С. Глух[2]

[1]НДІ медико-біологічних проблем ДУ «ДМА» МОЗ України, Дніпропетровськ
[2]ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Наведено результати досліджень гепатопротекторної дії біопрепаратів зі знежирених лецитинів сої та соняшнику за умов інтоксикації експериментальних тварин тетрахлорметаном.

Аналіз результатів досліджень впливу біопрепаратів зі знежирених лецитинів сої і соняшнику на біохімічні та гістологічні показники, змінені за умов інтоксикації, дає підстави зробити висновок, що обидва біопрепарати сповільнювали ріст маси печінки тварин, активність трансаміназ, стимулювали регенерацію печінки за рахунок поліплоїдизації та гіпертрофії гепатоцитів, відновлювали балкову і часточкову будова органа, а також здійснювали контакти між гепатоцитами і венозними судинами. Вони також підвищували кількість двоядерних гепатоцитів, що свідчить про активацію процесів репарації за їх введення на фоні інтоксикації.

Ключові слова: лецитини, тетрахлорметан, гепатопротектори.

HEPATOPROTECTIVE ACTION OF BIOPREPARATIONS FROM DEFATTED SOY AND SUNFLOWER LECITHINS

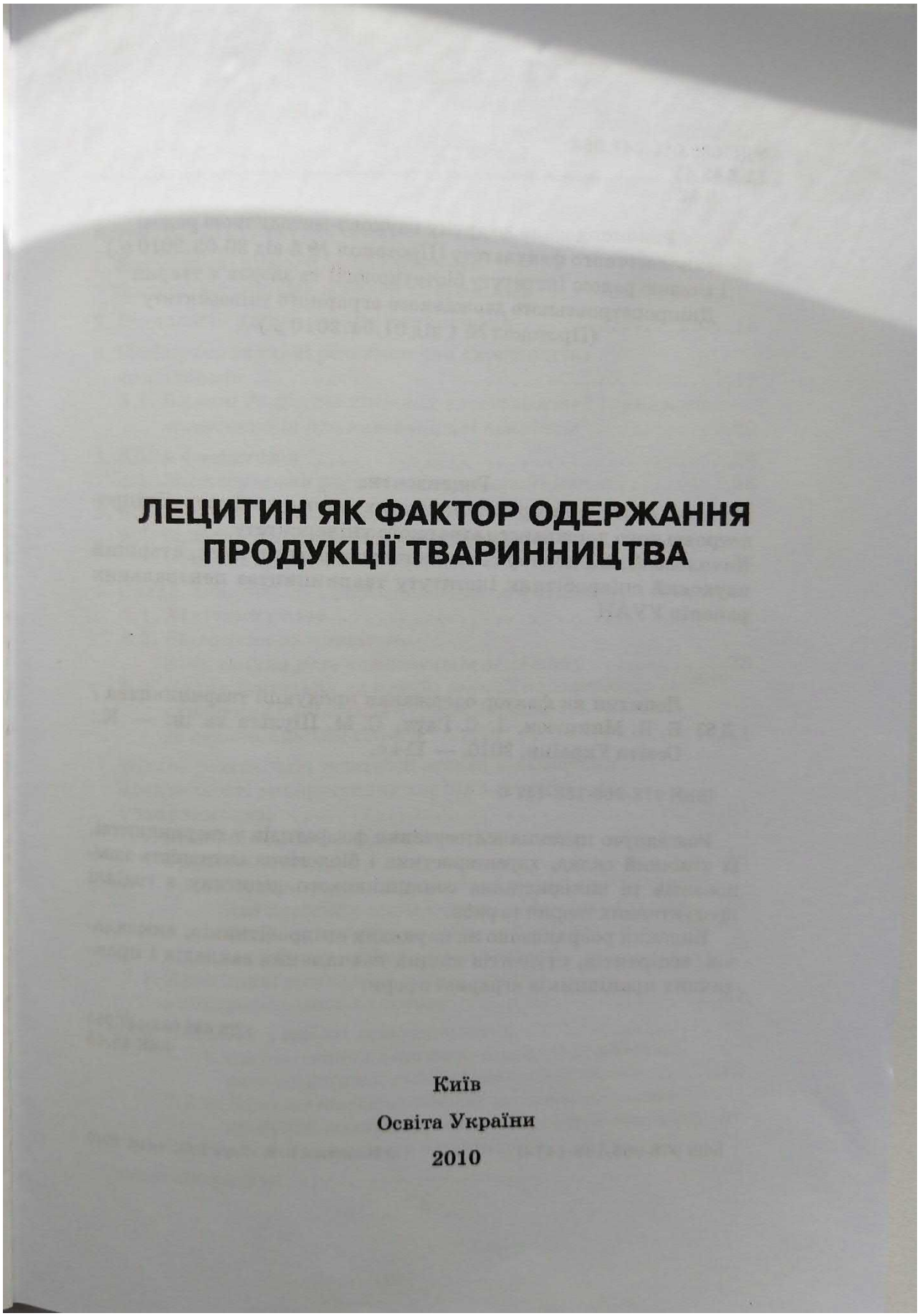
O. L. Drozdov[1]
S. M. Shulga[2]
M. Adab[1]
I. S. Glukh[2]

[1]Research Institute of Medical and Biological Problems of SE «DMA» Ministry of Health, Dnipropetrovsk
[2]State Organization «Institute of Food Biotechnology and Genomic» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv

E-mail: shulga5@i.ua

The results of studies of hepatoprotective activity of biopreparations of defatted soy and sunflower lecithins under carbon tetrachloride intoxication of the experimental animals are given. Analyze of biochemical and histological data under soy and sunflower lecithin exposure changed in terms of poisoning enables to conclude that both biological products of defatted lecithin slowed the growth of mass of animal liver and transaminase activity and stimulated liver regeneration as a result of polyploidy and hypertrophy of hepatocytes, resuscitated beam and lobulation organ and created contacts between hepatocytes and venous vessels as well. It is evidenced that repair processes are activated in condition of their injection under carbon tetrachloride intoxication.

Key words: lecithin, tetrachloromethane, hepatoprotectors.



ЛЕЦИТИН ЯК ФАКТОР ОДЕРЖАННЯ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА

Київ
Освіта України
2010

УДК 636.085:547.953
ББК 45.45
Л 53

Рекомендовано до друку науково-методичною радою біотехнологічного факультету (Протокол № 5 від 30.03.2010 р.) і вченою радою Інституту біотехнології та здоров'я тварин Дніпропетровського державного аграрного університету (Протокол № 4 від 01.04.2010 р.)

Рецензенти:
Високос М.П., доктор ветеринарних наук, професор Дніпропетровського державного аграрного університету
Качалова К. Я., доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник Інституту тваринництва центральних районів УУАН

Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва / Л 53 В. В. Микитюк, І. С. Глух, С. М. Шульга та ін. — К.: Освіта України, 2010. — 114 с.

ISBN 978-966-188-147-0

Розглянуто питання застосування фосфатидів у тваринництві, їх хімічний склад, характеристика і біологічна активність компонентів та використання соняшникового лецитину в годівлі продуктивних тварин та риби.

Видання розраховано на наукових співробітників, викладачів, аспірантів, студентів вищих навчальних закладів і практичних працівників аграрної сфери.

УДК 636.085:547.953
ББК 45.45

ISBN 978-966-188-147-0

© Микитюк В. В., Глух І. С., та ін. 2010

ЗМІСТ

Вступ 5
1. Зоотехнічні вимоги до комбікормів, білково-вітамінних добавок та премісів 7
2. Технологія приготування комбікормів 15
3. Біологічно активні речовини для виробництва комбікормів 17
3.1. *Вимоги до фізико-хімічних властивостей і сумісності компонентів при виробництві премісів* 20
4. Хімія фосфатидів 26
4.1. *Застосування фосфатидів в тваринництві* 28
5. Ефективність використання премісів в тваринництві 31
5.1. *Сумісність і збереження інгридієнтів у складі премісів* 32
6. Склад, властивості і фармакологічна дія лецитину 35
6.1. *Хімічний склад* 35
6.2. *Біологічна активність, фізіологічна роль компонентів лецитину* 38
6.3. *Вплив лецитину на перебіг реакції пероксидного окиснення біомолекул в організмі тварин за оксидативного стресу* 44
7. Фізико-біохімічні і генетичні основи підвищення ефективності використання кормів з лецитином у тваринництві 51
7.1. *Ефективність використання лецитину в раціоні свиней* 51
7.1.1. *Використання лецитину в складі комбікорму для поросних свиноматок і підсисних поросят* 53
7.1.2. *Застосування лецитину в годівлі ремонтного молодняку і відгодівельних свиней* 60
7.2. *Ефективні технології годівлі птиці з використанням лецитину* 67
7.3. *Лецитин у годівлі жуйних тварин* 82
7.3.1. *Застосування лецитину в годівлі молодняка великої рогатої худоби в молочний період* 82
7.3.2. *Корекція кількісно-якісних показників молочної продукції шляхом додавання до раціонів лецитину* 87
7.4. *Застосування лецитину в рибництві* 91
Список літератури 102

• Умови і тривалість зберігання.
• Якість складових компонентів вітамінів.
• Фактори хімічної або фізичної дії — тепло, тиск, тертя, вологість, кислотно-лужні реакції (величина pH).

На стабільність БАР в кормових сумішах негативно впливає підвищений вміст води. При вологості 13–14% слід чекати інтенсивнішого руйнування БАР. У премісах і мінеральних сумішах втрати вітамінів спостерігаються вже при значно менших кількостях вологи. З цієї причини необхідно до мінімуму скоротити добавки вологовмісних компонентів, призначених для зв'язування пиловидних часток. Оптимальна вологість преміксу — 10%.

У деяких сполученнях мікроелементів є наявна кількість кристалізаційної води. Слабко утримувана кристалізаційна вода, що перебуває в молекулах, може вивільнятися при зберіганні, наприклад, під дією тривалого теплового впливу або за рахунок таких гігроскопічних субстанцій, як холін-хлорид. В результаті потенціал реакції підвищується і настає більш інтенсивне руйнування вітамінів.

Макро-і мікроелементи спричиняють окислювально-відновні реакції, які можуть руйнувати вітаміни. Найбільш агресивні речовини — гігроскопічні сульфати, привносять в премікс вільну воду та активний іон. Окисли і карбонати, навпаки, дають спроможність обмежити ці хімічні реакції. Виняток: деякі окисли можуть бути дуже реакційноздатними (наприклад, окис магнію).

Коли суміші повинні зберігатися протягом дуже тривалого часу, наполегливо рекомендується, за можливістю, готувати окремо: премікси, що містять вітаміни, і премікси з мікроелементами.

Макро- і мікроелементи часто виступають каталізаторами хімічних реакцій за участю вітамінів. У цьому сенсі сульфати вважаються в премісах найбільш агресивними. Тому використання карбонатів або оксидів мікроелементів (за винятком окислу магнію), які, до речі, менш гігроскопічні, обмежує протягом хімічних реакцій і розпад вітамінів. Проте біологічна доступність таких форм мікроелементів може бути менше, ніж сульфатних форм.

Такі механічні дії, як дроблення, тертя, розчавлювання, підсилюють контакт вітамінів з іншими реакційноздатними компонентами сумішей. Окислювально — відновні реакції посилюються під впливом ультрафіолетових променів. Особливо

У більшості гранульованих і екструдованих кормів в перший місяць зберігання орієнтуються на дуже високий рівень втрат вітамінів, який потім зменшується. Найбільш інтенсивні втрати вітамінів можуть бути в щойно вироблених мінеральних кормах з мелясою. Пізніше, в наступні місяці, втрати знижуються, оскільки хімічні процеси перетворення частково вже завершуються.

3.1. Вимоги до фізико-хімічних властивостей і сумісності компонентів при виробництві преміксів

Прагнення створити кормові комплекси, які забезпечили б продуктивний ефект вище за суму результатів дії окремих компонентів, повинно стати основним принципом в розробці рецептів. Однак не будь-яке об'єднання препаратів при згодовуванні дає бажані результати, які можуть позначитися за своєю природою інгібіторами ферментів, речовинами з негативними властивостями. Захист компонентів від взаєморуйнування покликані виконувати наповнювач. Вони зменшують міру контакту мікрокомпонентів і можливості участі в хімічних реакціях. Проте будь-який наповнювач, навіть самий добрий, здатний виконувати стримуючі функції захисту тільки в період виробництва і зберігання компоненту, вже на початку травного тракту така дія припиняється. Активна речовина при цьому покривається спеціальним захисним матеріалом, який не руйнується до певної ділянки травного тракту. Потім оболонка гранули розчиняється, і вміст з незмінним хімічним складом опиняється в ділянці найбільш інтенсивної абсорбції. Як оболонка використовуються різні матеріали (зазвичай — це похідні ненасиченого ефіру целюлози).

Об'єднання деяких активних речовин в комплекси через певну хімічну агресивність окремих компонентів веде до руйнування початкової дії, утворення нових хімічних сполук, які можуть опинитися за своєю природою інгібіторами ферментів, речовинами з негативними властивостями.

Тому, визначаючи потребу тварин в тій або іншій біологічно активній речовині, одночасно слід встановлювати поєднання з іншими препаратами і на підставі даних про їх взаємодію судити про потребу організму в мікроелементах раціону. Потреба тварин у всіх взаємодіючих речовинах може бути в деяких

чутливі до дії світла вітаміни А, $Д_3$, Е і групи В. Якщо премікси зберігати при температурі вище 25°, то подвоюється швидкість втрати активності вітамінів. Малочутливі до нагрівання вітаміни Е, B_2, B_{12}, ніацин.

Холін-хлорид (вітамін B_4), який є гігроскопічним, вивільняє дуже агресивний хлоридний іон. Тому рекомендується включати холін-хлорид безпосередньо в корм, а не в премікс.

Холін-хлорид є гігроскопічною субстанцією і особливо при великому дозуванні (більше 5–10%) негативно впливає на стабільність деяких вітамінів: B_1 B_6, Д і фолієвої кислоти. Холін-хлорид не можна додавати в кормосуміші у вигляді розчину, він застосовується тільки у формі порошку. Дія препарату холін-хлориду на стабільність вітаміну Е відносно низька. Не відмічено також ніякої негативної дії на вітамін А (захисна форма) за вмісту в преміксі порошку холін-хлориду в кількості 12%.

Тіамін швидко руйнується в холіновому мінеральному преміксі, якщо він має високу вологість і pH 4–5. Якщо ж pH кормосуміші складає 7–8 і її вологість низька, то тіамін стійкий до руйнувань. У преміксах тіамін мононітрат стабільніший, ніж тіамін гідрохлорид.

Зважаючи на вищевикладене рекомендуються вітамінні премікси, призначені для тривалого зберігання, готувати окремо від мінеральних преміксів. Важливий фактор, що впливає на стабільність вітамінів, — тривалість і температура зберігання продукції. Чим довше зберігається продукція і чим вище температура, при якій вона зберігається, тим, природно, втрати більші.

Окремі вітаміни при зберіганні в прохолодному місці достатньо стабільні, як правило, більше одного року. І тому вітаміни можуть бути використані і після закінчення гарантійного терміну придатності, якщо не виявлені явні зміни їх якості, але у будь-якому випадку потрібно провести аналіз на їх вміст, щоб компенсувати недостатню кількість за рахунок збільшення дозування.

При експандуванні і екструдуванні кормових сумішей температура вище, ніж в процесі гранулювання. Крім того, в обох процесах застосовують високий тиск. З іншого боку, при екструдуванні втрати вітамінів зазвичай вищі, ніж при експандуванні.

Вітамін С кристалічний взагалі для екструзії непридатний і майже цілком руйнується.

випадках нижче, а в інших вище вже існуючих розроблених без урахування комплексного застосування препаратів.

Не можна забувати і про те, що біологічно активні речовини неоднорідні за своїми фізіологічним призначенням: є група, яка віднесена до факторів живлення, інші групи виконують функції каталізаторів обміну речовин або стимулюють ріст і відгодівлю тварин. Потрібно також враховувати додаткову потребу тварин у вітамінах як противостресових факторах.

Антистресові премікси використовують в періоди напруги в організмі тварин, викликаних наступними подразниками: різка зміна мікроклімату, під час проведення ветеринарних і зоотехнічних заходів, транспортування тварин на далекі відстані та ін. Стреси можуть змінювати потребу у вітамінах А, аскорбіновій, пантотеновій кислотах. Антистресові премікси містять підвищені (у 2–3 рази) дози деяких вітамінів, транквілізаторів і лікарських засобів. Їх вводять в комбікорми в кількості 2% по масі раціону за 2–3 дні до передбачуваної стресової дії і протягом 3–5 днів після її припинення.

Чим менша кількість компонентів вводиться до складу корму (або попередній суміші), тим більший ступінь подрібнення потрібний для використовуваного препарату.

Обираючи компоненти для виробництва преміксів, враховують форму і характер поверхні часток, здатність утворювати і нести електростатичний заряд та ін. Ці властивості препаратів значною мірою зумовлюють такі технологічні їх характеристики, як сипучість, схильність до склеювання в бункерах, ущільнення і злежування при зберіганні, налипання на обладнання в процесі виробництва, здатність до пилоутворення.

Тенденцію до накопичення статичної електрики і пилоутворення мають найчастіше тонкодисперсні сухі високоочищені препарати (B_2; B_5; деякі антибіотики та ін.). Такі продукти в процесі змішування і транспортування можуть налипати на стінки і робочі частини обладнання, викликаючи порушення дозування і гомогенності змішування премікса.

З погляду біодоступності, економіки, фізико-хімічних і технологічних властивостей найбільш придатними є оксиди мікроелементів, окрім оксидів заліза і кобальту, які погано засвоюються. Дуже перспективні хелатні з'єднання мікроелементів. Якщо немає в наявності цих з'єднань мікроелементів (хелатів, оксидів, карбонатів), то доцільно окремо готувати вітамінний і мінеральний премікси і вносити їх послідовно в комбікорми в процесі змішування компонентів.

Біологічно активні речовини, що вводяться в премікси, так само як і наповнювач, повинні відповідати певним вимогам, головні з яких — стійкість по відношенню до наповнювача і один до одного, здатність володіти хімічною сумісністю. Не менш важливою вимогою є і те, щоб вони мали певний розмір часток для рівномірного розподілу по всьому комбікорму. Солі мікроелементів, наприклад, перед приготуванням преміксу мають бути подрібнені, а вітаміни у разі їх злежування просіяні через відповідне сито. Розмір часток БАР залежить від їх кількості, введених в комбікорм, і повинен складати при введенні його в 1 т комбікорму: в кількості у кількості 1 г — 0,075 мм, 10 г — 0,1 мм, 50 г — 0,17 мм, 250 г — 0,27 мм і 1000 г — 0,45 мм.

Значення наповнювачів при виробництві комбікормів

БАР складають від 2 до 30% (частіше 6–10%) від маси преміксу решта всієї ж маси — наповнювач, який багато в чому визначає якість і стабільність преміксу. Основне призначення наповнювача — забезпечити оптимальне перемішування і рівномірний розподіл БАР в об'ємі корму. Досвід показав, що такий оптимальний об'єм преміксу і складає від 0,2 до 1% маси корму.

Наповнювачі, виходячи з їх фізико-хімічних і технологічних властивостей, підрозділяють на носій і розбавлювач. Як носій компонентів преміксу придатною є рослинна сировина, а як розбавлювач використовують мінеральні джерела (крейда, вапнякове борошно, фосфати кальцію, кухонна сіль, бентоніти, природні цеоліти).

Жоден з наповнювачів не відповідає всьому комплексу вимог, тому зараз часто використовують певне поєднання носія і розчинника. Зміст носія має бути не менше 30% від маси преміксу. Розчинник потрібно вносити до преміксу на останній стадії його приготування.

Розбавлення сприяє зменшенню ступеня контактів в премікс між неоднорідними групами біоактивних компонентів і можливих несприятливих взаємодій.

Основна функція наповнювача — забезпечити оптимальний об'єм попередньої суміші, її технологічність при виготовленні комбікорму і рівномірний розподіл в ньому всіх біоактивних компонентів преміксу. Для виробництва преміксів використовують два типи наповнювача — органічний і мінеральний. Як органічний наповнювач найчастіше використовують висівки або спеціально підготовлену муку. Розмір часток

органічного наповнювача варіює від 100 до 600 мк. Вибір розміру частинок наповнювача залежить від типу преміксу та його призначення. Якщо необхідно додати до преміксу велику, за інших рівних умов, стабільність, використовують частки більшого розміру. Якщо потрібна найвища якість розподілу компонентів, наповнювач береться дрібної фракції.

Здатність наповнювача поглинати і утримувати порошкоподібні з'єднання мікродобавок може бути збільшена додаванням до нього мікродобавок. Окрім пшеничних висівок як наповнювач можуть бути використані рисові висівки; подрібнені зерна пшениці, жита, ячменю; борошно пшеничне; шрот соєвий і соняшникові; макуха соєва і соняшникова; дріжджі кормові.

Інтегральні компоненти наповнювача повинні відповідати тим же вимогам по однорідності, розмірам часток і сипучості, що і організм.

На думку багатьох дослідників, наповнювач для преміксів повинен відповідати наступним вимогам: pH, близький до нейтрального (оптимально 5,5–7,5); сумісність використовуваних БАР, добра ємкість (здатність «нести» компоненти); відсутність підвищеної схильності до пилоутворення і накопичення статичної електрики.

НАПОВНЮВАЧ:

- кормовий рослинний засіб;
- запобігає розшаруванню суміші;
- покращує плавкість преміксу;
- нейтралізує і не накопичує статичну електрику;
- зв'язує вільну воду і дрібні частки в премікс;
- оптимізує щільність преміксу;
- не злежується, не порошить;
- добра сипучість;
- pH 5,5–7,5;
- розмір часток до 1,2 мм;
- вологість до 10%;
- стабільність при зберіганні;
- не поглинає вологу;
- щільність 1,1–1,3 г/см^3;
- об'ємна маса 220–650 кг/м^3.

РОЗЧИННИК:

- мінеральна сировина;
- покращує плавкість преміксу;
- запобігає розшаруванню суміші;
- знижує вологість преміксу;

- не зв'язує дрібні частки премікcу;
- оптимізує щільність премікcу;
- не злежується;
- не поглинає вологу;
- розмір часток до 0,6 мм;
- вологість до 5%;
- об'ємна маса 1000–1700 кг/м³;
- щільність 2,5–3,2 г/см³.

За регламентом базової технології виробництва комбікормів вологість висівок не повинна перевищувати 9%. Інколи використовують висівки з вологістю 6%. Вологість продуктів переробки зерна допускається ДСТУ до 13,5%, але для виробників премікcів вона є неприйнятною.

Через високу адгезійну здатність поверхні часток зернових продуктів, дрібні частки БАР міцно утримуються на них в процесі зберігання і транспортування. Знежирений соєвий шрот, навпаки, не володіє необхідними адгезивними властивостями. Отриманий на його основі премікс при упаковці і транспортуванні швидко розшаровується: у нижній частині мішка опиняється велика частина внесених до премікcу мікроелементів і вітамінів. Проте шроти інколи застосовують як наповнювач. Для зменшення порохнявості премікcу в нього рекомендується вводити невелику кількість жиру (2–3%) (табл. 1).

Таблиця 1 — **Технологічні властивості наповнювачів**

Наповнювач	Вологість, %	Об'ємна маса, кг/м³	Кут природного відкосу, град	Характер наповнювача	Нейтралізація статичної напруги	Зв'язування води	плавлення
Висівки пшеничні	14	524		НО*	+++	+++	+
Мучка пшенична	14	540	43	НО	+++	++	++
Мучка рисова	14	445	55	НО	+++	++	++ +
Мучка кукурудзяна	14	615		НО	+++	–	++ +
Шрот соєвий	9,5	540	48	НО	–	–	++ +
Дріжджі кормові	8,0	400	46	НО	–	–	++ +

Закінчення таблиці

Мів кормовий	7,0	1 190	45	РА**	–	–	–
Сіль куховарська	0,1	1 380	44	РА	+	+	++
Трикальцій фосфат	0,1	1 540	43	РА	–	–	++ +
Цеоліти природні	10	965	41	РА	–	+++	++
Сапропель висушений	10	1 200	39	РА, НО	+	++	+
Мука вапнякова	1,5	1 550	36	РА	–	–	++ +

*НО — носій
**РА — розбавлювач

Цеоліти як наповнювач потребують перегляду мінеральної частки премікcу, регулювання вмісту кремнію, а головне, має місце низька утримуюча здатність. Неприпустимим є наповнювач у вигляді вапнякового борошна. Втрати БАР з цим наповнювачем підтверджуються на всіх комбікормових заводах. Вапнякове борошно осідає з усім, що трапляється на його шляху.

Відомо, що багато вітамінних препаратів, запозичені із медичної практики додаються в премікси, внаслідок великої аерації киснем повітря швидко окислюються і руйнуються. Для стабілізації таких вітамінів в премікси зазвичай вводять антиоксиданти (частіше всього сантохін або бутілоксітолуол). Жиророзчинні вітаміни сьогодні використовуються тільки у формі захищених від дії повітря препаратів (мікрогранули, мікрокапсули).

4. ХІМІЯ ФОСФАТИДІВ

Фосфатиди належать до поширеної групи фосфоровмісних речовин, що мають важливе фізіологічне значення, оскільки входять до складу кожної клітини тварин і рослин. Без них неможливий внутріклітинний обмін. Велика кількість фосфатидів міститься в нервовій тканині, серці, печінці, нирках, селезінці, еритроцитах — від 0,05 до 11%. Дуже багато їх в яєчному жовтку — 9–11%. У значній кількості фосфатиди виявлені і в сперматозоїдах у спермі барана 90% фосфатидів знаходиться у сперматозоїдах і лише 10% — у плазмі.

У рослинах фосфатиди містяться в основному в зерні особливо олійних культур. Багато їх в зерні сої, бавовника, соняшнику, льону чечевиці конопель, рапсу, арахісу і рицини.

Фосфатиди класифікуються наступним чином: холін -фосфатиди або лецитини коламінфосфатиди, або кефаліни; серинфосфатиди; ацетальфосфатиди; інозитфосфатиди; сфінгофосфатиди, або сфінгомієлини. Найбільш поширені і добре вивчені холінфосфатиди, або лецитини.

Холінфосфатиди є складними ефірами, до складу яких входять гліцерин, жирні кислоти, фосфорна кислота і азотиста основа — холін. Утворюються вони шляхом взаємодії гліцерину з двома молекулами жирних кислот і молекулою фосфорної кислоти, яка у свою чергу сполучена ефірним зв'язком з холіном. Таким чином, за своєю будовою фосфатиди дуже близькі до жирів, але відрізняються від останніх наявністю фосфорної кислоти і азотистої холіну.

До складу фосфатидів входять як насичені, так і ненасичені жирні кислоти, а такі жирні кислоти, як лінолева, ліноленова і арахідонова, не можуть утворюватися в організмі тварин, тому повинні поступати з їжею. Присутність вказаних кислот у фосфатидах підвищує біологічну цінність останніх. Ці кислоти містяться переважно в тригліцеридах рослинних олій (соняшникове, лляне, соєве та ін.). Міра потреби в цих кислотах поки що не встановлена проте відмічено, що без вмісту їх в кормах від тварин не можна отримати високу продуктивність.

В даний час вважають що такі ненасичені жирні кислоти, як лінолева, ліноленова і арахідонова діють як біокаталізатори, тому їх відносять до речовин з вітамінною дією.

Таблиця 2 — **Вміст жирних кислот у фосфатидах, отриманих з різних олій,% (дані Гильчида і Заки)**

Жирні кислоти	Фосфатиди					
	соєві	соняшникові	бавовняні	лляні	арахісні	ріпакові
Міристинова	–	–	–	–	–	0,8
Пальмітинова	11,7	14,7	17,3	11,3	16,3	8,3
Стеаринова	4,0	5,1	7,3	10,6	2,8	–
Олеїнова	9,8	19,3	20,3	33,6	47,1	22,4
Лінолева	55,0	45,9	44,4	20,4	22,7	42,2
Ліноленова	4,0	–	–	17,3	–	–
Ерукова	–	–	–	–	22,7	

До складу кормових фосфатидів входить до 35% рослинної олії, до 40% білкових речовин і до 10–12% власне фосфатидів (лецитин). Фосфатидні концентрати містять до 50% фосфатидів і біля 40–50% жиру. Найбільший інтерес в кормовому відношенні представляють власне фосфатиди, до складу яких входять лецитини, кефаліни та інші речовини.

Основним елементом фосфатидів, що діє, зазвичай вважають лецитин, який знаходиться майже у всіх органах і тканинах рослинного і тваринного організму. До складу лецитину входить фосатидилхолін, що грає велику роль в обміні речовин. Під дією певних ферментів він може передавати свої метильні групи іншим речовинам і таким чином слугувати джерелом цих груп при синтезі деяких амінокислот. Холін підсилює відділення шлункового соку, викликає ритмічні рухи кишкових м'язів, позитивно впливає на обмінні процеси в печінці.

Недостатнє надходження лецитину протягом тривалого часу порушує роботу печінки: у ній відкладається до 50% нейтральних жирів замість 5% відповідно до норми. Це призводить до погіршення використання поживних речовин корму, сповільнюється також ріст і розвиток тварин, знижується продуктивність.

Ще А. Я. Даниловський вказував на дуже важливе значення лецитину в загальному обміні речовин і на те, що його таким чином необхідно ставити в один ряд такими поживними факторами, як білок, жир, вуглеводи, сіль і вода. «В особі лецитину, — говорив А. Я. Даниловський, — ми маємо могутній засіб для збагачення організму фосфором і, можливо, для відродження ферментів».

Кефаліни є природними антиоксидантами . Вони сприяють тривалому збереженню кормових фосфатидів, оскільки попереджають можливі процеси окислення жирів.

До 1920 р. основною сировиною для отримання фосфатидів був яєчний жовток, тому вони застосовувалися тільки в медицині. В даний час фосфатиди отримують з відходів при виробництві і очищенні рослинних олій.

Технологія виготовлення кормових напівзнежирених фосфатидів нескладна і може бути освоєна будь-яким олієекстракційним заводом. Отриманий на цих заводах екстракт піддають гідротації, при якій під великим тиском в олію вводять воду, що дистилює, фосфатиди від олії.

4.1. Застосування фосфатидів в тваринництві

Широка перевірка застосування фосфатидів в годівлі тварин і птиців сільськогосподарських підприємствах показала, що вони є своєрідним вітаміном росту для молодих тварин та птиці. При введенні в раціони невеликої кількості фосфатидів розвиток молодняку, підвищуються продуктивність, стійкість організму до захворювань, знижуються собівартість продукції і витрати кормів на одиницю приросту.

Досліди показали, що ефективнішою дія кормових фосфатидів була в тих господарствах, де відчувалася нестача кормів, багатих на білок та фосфор.

Для задоволення потреби тварин в біологічно активних речовинах (холіні, лецитині) сирі фосфатиди повинні вводитися в раціон з урахуванням фізіологічного стану тварин. Так, молодняку до 8-тижневого віку на 1 кг сухої речовини шротів потрібно давати 50–60 гр фосфатидів, дорослій птиці — до 35 гр, молодняку свиней — 18–27 грамів, дорослим свиням — до 15 гр за тієї умови, що у фосфатидах вміст лецитину складає 40%.

П. С. Капко вводив фосфатиди в раціони відлучених поросят відгодовуваного молодняку свиней по 30 гр на добу протягом двох місяців. Це підвищило прирости на 10,8% і знизило витрати кормів на 1 кг приросту на 12–13%.

В. А. Журба згодовував соняшникові фосфатиди молодняку свиней в період дорощення і відгодівлі (143 дні). Фосфатидний концентрат, введений в основний раціон 1,83 грама на 1 кг живої маси, позитивно вплинув на засвоєння поживних речовин кормів, сприяв інтенсивності росту, зниженню економії витрат кормів на одиницю приросту.

У Білоруській сільськогосподарській академії вивчалась ефективність використання лляних напівжирених фосфатидів Вітебського олієекстраційного заводу в раціонах відлучених поросят і свиней на відгодівлі. Встановлено, що ефективність використання цих фосфатидів залежала від ступеню забезпеченості тварин холіном: за меншої забезпеченості зростала потреба у фосфатидах. З трьох вивчених доз лляних фосфатидів (1; 2 і 3 гр на 1 кг маси тварин) кращими для відлучених поросят виявилися 2 гр/кг маси, для свиней на відгодівлі — 3 гр. Згодовування фосфатидів підвищувало прирости у зростаючих свиней на 20,6%, у свиней на відгодівлі — на 16,6%. Відповідно знизилися витрати кормів на 1 кг приросту на 17,8 і 17%. Від згодовування фосфатидів отримано додаткової продукції на суму, що перевищує витрати на придбання фосфатидів: у поросят відлучених — майже в 8 разів, у свиней на відгодівлі — в 5,8 разів.

Фосфатиди здійснюють позитивний вплив, перебуваючи в раціонах птиці. За даними А. А. Лесюїса, введення фосфатидів в раціони качок підвищує яйценоскість на 50%, курей — 40%.

Досліди кафедри годівлі сільськогосподарських тварин Саратовського зооветінституту із застосування фосфатидів курчатам і молодняку старших вікових груп, показали, що жива маса півників і молодок в порівнянні з контрольною групою підвищилася відповідно на 9,1% і 25%, забійний вихід — на 2 і 4,5%.

Як же краще згодовувати фосфатиди? Перш за все потрібно пам'ятати, що фосфатидні корми містять багато жиру, тому вводити їх в раціони тварин і птиці потрібно поступово, починаючи з малих доз.

Більшість вчених рекомендують включати фосфатиди до складу розмолотих концентрованих кормів у вигляді емульсії, виготовленої на теплій воді (температура 40–50°) в співвідношенні 1 : 5.

Фосфатиди добре набухають у воді, тому їх легко дозувати. Проте, на наш погляд, найбільш ефективний метод використання фосфатидів — це включення їх до складу комбікормів (краще гранульованих). Комбікорм з фосфатидами краще зберігається.

А. П. Шестунова згодовувала підсвинкам протягом 100 днів комбікорм, в якому було 2 і 3% соняшникового фосфатидного концентрату. Кращі результати отримані при використанні комбікорму з 2% фосфатидного концентрату. Поросята, що

отримували такий корм, дали приросту на 24% більше, ніж контрольні, витрата кормів на 1 кг приросту була на 21,6% нижче, ніж в контрольній групі. На одного поросяти в цій дослідній групі отримано додаткової продукції (жива вага) на суму 7 р. 44 коп., що перевищує грошові витрати на фосфатидний концентрат майже в 7 разів.

Таку ж норму сирих соняшникових фосфатидів А. П. Шестунова рекомендує використовувати при збагаченні комбікормів для курчат старше 40 днів.

П. Т. Буренков вивчав ефективність використання соєвих фосфатидів в комбікормах для курчат в кількості 1,5; 2 і 3% від ваги комбікорму. Збагачували комбікорми фосфатидами шляхом введення збагаченого фосфатидами соєвого шроту.

Досліди показали, що такі комбікорми позитивно впливають на організм птиці в тому випадку, якщо комбікорм насичений мікроелементами. Зі всіх вивчених доз соєвих фосфатидів кращою була доза в кількості 2% від ваги корму.

Таким чином, застосування фосфатидів в годівлі сільськогосподарських тварин і птиці є резервом підвищення продуктивності тварин.

У зв'язку з відсутністю виробництва лецитину в нашій країні він у годівлі тварин не застосовувався, а за кордоном використовували тільки соєвий.

5. ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ПРЕМІКСІВ В ТВАРИННИЦТВІ

Вітчизняний і зарубіжний досвід свідчить про високу ефективність застосування premіксів в тваринництві та птахівництві.

Застосування біологічно активних речовин у складі premіксів при годівлі свиней і птиці дозволяє значно знизити витрату кормів на 1 кг приросту.

Таблиця 3 — **Витрати кормів на 1 кг приросту свиней і птиці**

Раціон	Витрати кормів на 1 кг приросту, кг
Незбалансований	7–8
Збалансований по перетравному протеїну, кальцію, фосфору, куховарській солі, клітковині, каротину	5–6
З додаванням вітамінів	4
З додаванням антибіотиків	4
Повноцінний раціон, збалансований за всіма поживними речовинами з додаванням біологічно активних і лікарських речовин для свиней	3,0–3,4
для птиці	1,8–2,3

Питома вага комбікормів, що виготовляє промисловість, складає близько 50% загальної потреби в концентрованих кормах. У зв'язку з цим значна частина концентратів буде згодовуватися тваринам у вигляді простих зернових сумішей, виготовлених на власних підприємствах і сільськогосподарських комбікормових заводах. Проте, при використанні сумішей, незбалансованих поживними і біологічно активними речовинами, нераціонально витрачається і втрачається величезна кількість зерна. Щоб цього уникнути, необхідно в зернові суміші вводити різні біологічно-активні добавки.

Збільшення виробництва premіксів в країні до об'єму, що задовольняє потребу тваринництва, сприятиме підвищенню ефективності використання кормів і продуктивності тварин.

Негативно впливають на збереження деяких компонентів високі (понад 100 кг/т) концентрації холінхлориду, хоча сам він дуже стійкий.

Все це необхідно враховувати при складанні рецептури преміксів, виборі джерел сировини і розробок технології виробництва. Особливу увагу при виробництві преміксів необхідно приділяти умовам зберігання: упаковки продукту, оберіганню його від надмірного зволоження.

Досвід роботи спеціалізованих заводів свідчить про те, що за нормальних умов зберігання, коли вологість преміксів не перевищує 10%, істотних змін активності біологічно активних компонентів преміксів протягом 6 місяців зберігання не спостерігається.

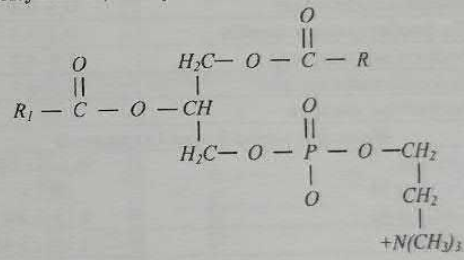
6. СКЛАД, ВЛАСТИВОСТІ І ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ ЛЕЦИТИНУ

6.1. Хімічний склад

Лецитин — екологічно чистий, натуральний продукт, виділений із соняшнику. Лецитин містить не менше 96,5% фосфатидів (фосфоліпідів), жиру — не більше 20%.

Один із перших фосфоліпідів був виділений з яєчного жовтка і дістав назву — лецитин (lethiotos — грец., жовток).

Молекули лецитину



містять полярну головку і два неполярних вуглецевих хвости (рис. 1). Вони являють собою складні ефіри жирних кислот і спиртів. До їх складу входять також азотвмісні речовини і фосфорна кислота.

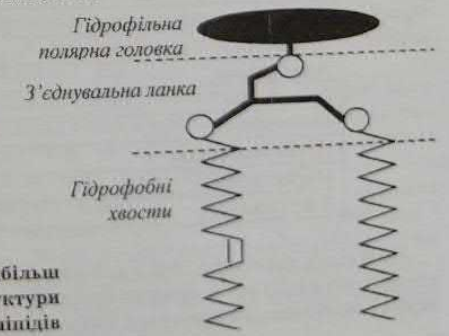


Рис. 1. Схема найбільш вірогідної структури фосфоліпідів

Молекула лецитину побудована так, що два гідроксили гліцерину сполучені з двома молекулами вищих жирних кислот, з яких одна ненасичена. Третій гідроксил сполучається з фосфорною кислотою, до якої приєднана азотиста основа — холін.

Таблиця 4 — Склад лецитину,%

Складник	Кількість, %
Ліпідний склад	
Фосфатидилетаноламін	24,3–25,2
Фосфатидилхолін	26,8–28,2
Фосфатидилсерин	13,0–14,0
Фосфатидилінозитол	14,2–15,0
Лізофосфатидилхолін	0,3–0,4
Лізофосфатидилетаноламін	0,2–0,3
Фосфатидилгліцерол	3,9–4,3
Дифосфатидилгліцерол	6,3–6,9
Фосфатидні кислоти	7,3–7,5
Жирнокислотний склад лецитину	
Лінолева (С 18:2 ω 6) (С 18:2 ω 4)	59,6–61,79 60,15 0,15–1,64
Олеїнова	10,34–12,48
Пальмітинова	15,79–19,10
Ейкозаптрієнова	0,11–0,20
Докозадієнова	0,30–0,43
Докозатріснова	0,18–0,31
Ліноленова	0,41–0,61
Бегенова	1,20–1,71
Арахінова	0,39–0,57
Арахідонова	0,16–0,68
Стеаринова	5,45–6,07
Маргаринова	0,18–0,22
Пальмітоолеїнова	0,10–0,13
Міристінова	0,06–0,09
Пентадеканова	0,06–0,07

Необхідно відмітити, що в цій книзі розглядається використання вітчизняного соняшникового лецитину, тоді як у всьому світі використовується лише соєвий лецитин.

Порівняльні характеристики соняшникового та соєвого лецитинів, проведені фірмою Lucas Meyer у м. Гамбург, показали, що за основними показниками вони ідентичні, а за деякими (вміст тригліцеридів та вільних жирних кислот) вітчизняний лецитин переважає імпортні аналоги (рис. 2).

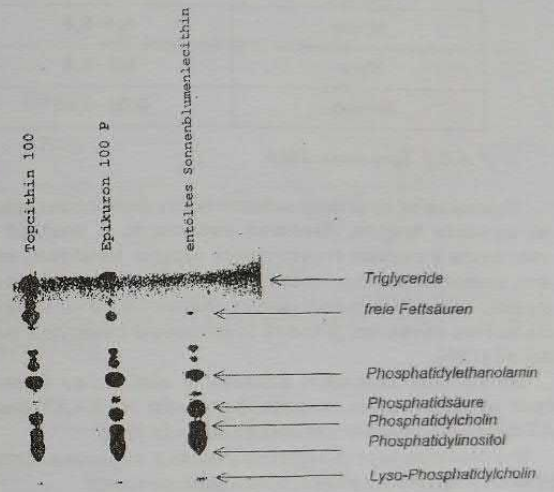


Рис. 2. Вміст тригліцеридів та вільних жирних кислот

Найбільш цінна ліпідна частина сухого лецитину — фосфатиди (табл. 4): фосфатилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол та ін. В жирнокислотному складі переважає ліно-лева кислота (59,06–61,79).

Фосфоліпіди відіграють дуже важливу роль у будові організму та в обміні речовин. Вони є необхідними компонентами всіх без винятку клітин. Фосфоліпіди разом з іншими ліноїдами складають основну масу протоплазматичних, або конституцій-них, ліпідів (табл. 5). Фосфоліпіди займають переважну частину ліпідів ядра, мітохондрій, рибосом і гіалоплазми клітин. З фосфоліпідами пов'язані важливі функції біомембран: бар'єрно-транспортна, ферментативна і біологічна. Фосфоліпіди складають 40% клітинних мембран, підтримуючи їх функціональну цілісність.

Таблиця 5 — **вміст фосфатидів в органах, тканинах і рідинах сільськогосподарських тварин (на сиру масу)**

Орган, тканина чи рідина	Кількість фосфатидів,%
Печінка	2,5–3,0
М'язи	0,4–0,6
Кров	0,2–0,3
Молоко	0,02–0,05

* *за С. І. Афонським, 1989*

Компоненти лецитину забезпечують його позитивний вплив на організм тварин. Лінолева кислота та її похідні використовуються у синтезі структурних ліпідів мембран, які займають центральне положення в організмі клітин, забезпечують їх функції [55, 57], а також синтез ейкозаноїдів — великої групи біологічно активних речовин із широким спектром регуляторної дії [120].

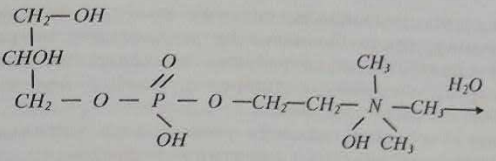
Збільшення лінолевої кислоти у ліпідному біошарі мембран кардіоміоцитів активує ферменти N+K+AT-фаза, Ca^2 ± AT-фаза) — основних катіонних насосів [90].

Фосфоліпіди беруть активну участь у перетравленні, всмоктуванні й транспортуванні поживних речовин.

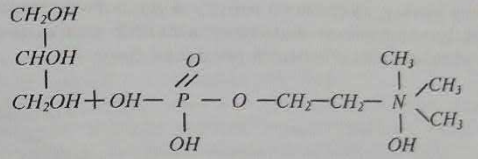
Унікальний склад лецитину сприяє підвищенню адаптаційних можливостей організму тварин, посилює анаболічні процеси в організмі внаслідок використання його тканинами складових лецитину для енергетичних і структурних потреб.

6.2. Біологічна активність. Фізіологічна роль компонентів лецитину

Фосфатиди, які поступають з кормом у шлунково-кишковий тракт сільськогосподарських тварин емульгуються під впливом фосфоліпази. Встановлено, що ферменти підшлункової залози гідролізують фосфатиди, відщеплюючи жирну кислоту в другій позиції лецитину. В результаті гідролітичного розщеплення фосфатидів утворюється гліцерофосфорилхолін, який гідролізується до гліцерину і холінфосфату [53]:

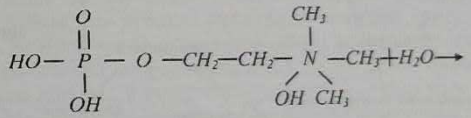


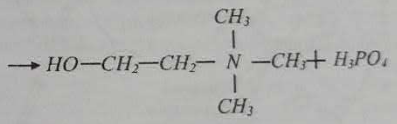
Гліцерофосфорилхолін



Холінфосфат

Подальше розщеплення здійснюється внутріклітинно (відповідна гідролаза в гомогенаті ентероцитів) до холіну і фосфорної кислоти [107]:





Дефосфорилювання і звільнення холіну відбувається на апікальній мембрані ентероциту і всмоктується вільний холін. У дослідах із синтетичним холіном на вивернутих відрізках кишок було показано, що холін всмоктується шляхом активного транспорту, для якого необхідні кисень і затрата енергії [107].

Як видно зі схеми, холін поступає із кров'ю в печінку і використовується в синтезі холінфосфатидів, головним чином ле-цитину. Дослідженнями багатьох авторів було встановлено, що ендогенний синтез холіну, наприклад у птиці, є недостатнім для нормалізації обміну речовин [3, 16].

В організмі незначна частина холіну синтезується із етаноламіну, проте біосинтез не задовольняє потреб телят, свиней і птиці. Вони потребують надходження екзогенного холіну [20]. Лецитин є джерелом холіну для тварин за наявності його в їх раціонах.

Холін в організмі виконує роль донора метильних груп у біосинтезі адреналіну, креатину і метіоніну, а також медіатора нервового збудження — ацетилхоліну, який є посередником у передачі нервового збудження, у регулюванні серцевого ритму, судинного тонусу м'язового скорочення і т. д.

Після розщеплення лецитину вільний холін використовується у відповідних обмінних реакціях (рис. 3).

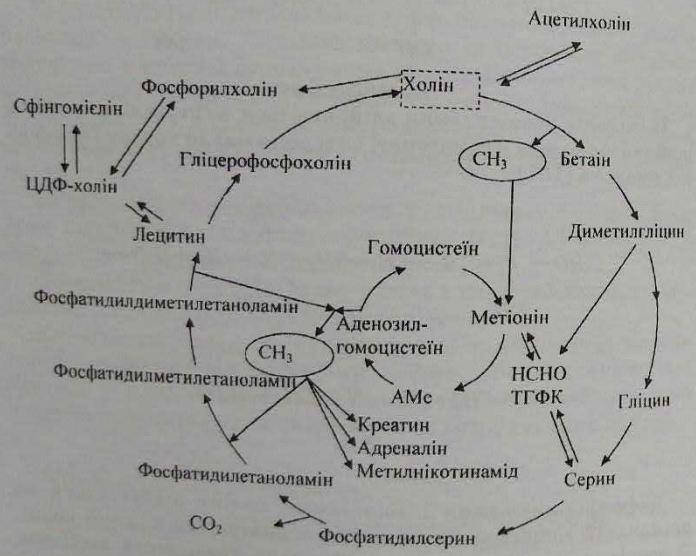


Рис. 3.

Шляхом метилування за рахунок холіну знешкоджуються деякі токсичні речовини, які можуть поступити в організм.

Потрапляючи з кров'ю в печінку, холін використовується в синтезі лецитину, а невелика його частина циркулює в крові у вільному вигляді.

В основі всмоктування ліпідів лежить комплекс складних біохімічних процесів, для здійснення яких використовується енергія, акумульована в макроергічних фосфатних зв'язках АТФ. Найкраще всмоктуються ненасичені жирні кислоти. Ступінь всмоктування жирних кислот становить 96–98% [74].

З різних ліпідів, що всмокталися, дуже швидко засвоюються організмом неетерифіковані, тобто вільні, жирні кислоти.

Згідно з даними багатьох науковців, більша половина енергії основного обміну у тварин забезпечується окисненням цих кислот.

Ненасичені жирні кислоти окиснюються легше, ніж насичені, причому активність цього процесу здебільшого залежить від кількості подвійних зв'язків [56, 74].

Обмін фосфоліпідів тісно пов'язаний з обміном жирів. Ця група складних ліпідів сприяє всмоктуванню, розчиненню, тра-нспортуванню, а також окисненню жирів у тканинах.

У разі нестачі фосфатидів у кормах, кількість жирів у печінці значно збільшується, що може призвести до жирового її пе-ереродження. Стимулюючий вплив на перетворення жирів мають також азотисті основи фосфоліпідів, такі як холін і етаноламін, тому їх називають ліпотропними факторами. Це пов'язано з тим, що згадані субстрати потрібні для утворення лецитину, який значно стимулює обмін жирів. Лецитин утворює ліпопротеїнові комплекси, які є основними транспортними формами ліпідів, у тому числі тригліцеридів і холестерину.

В епітеліальних клітинах із молекул фосфоліпідів, вітамінів, холестерину, краплин жиру, який всмоктався, і білків утворюються хіломікрони діаметром 150–200 нм (рис. 4).



Рис. 4. Схема будови хіломікрону

Хіломікрони через бічні поверхні і базальний край клітини дифундують у міжклітинну рідину [58]. Частина ліпідів, в основному фосфатиди, надходять із міжклітинного простору в кров'яне русло, печінку і використовуються організмом для різних потреб.

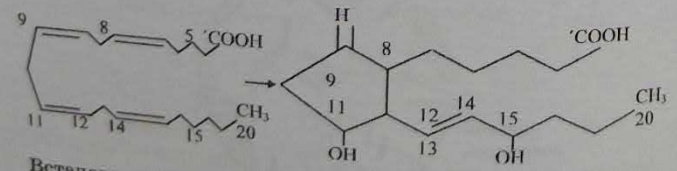
Однією з характерних ознак порушеного обміну холіну і холестерину є нестача лінолевої, ліноленової і арахідонової кислот.

Ефіри холестерину з багатоненасиченими жирними кислотами є важливою транспортною формою стеридів, а отже, необхідною ланкою їх метаболізму. Зокрема, в крові і в деяких органах зростає концентрація холестерину, що пов'язано з послабленням його асиміляції. Встановлено, що згадані багатоненасичені жирні кислоти знищують холестеринемію, стимулюючи обмін холестерину в печінці і виділення його з жовчі. Це сприяє зниженню жиру в печінці, використанню його, а також послаблює відкладання холестерину в стінках судин.

Відомо, що печінка займає основне місце в регуляції обміну речовин, зв'язуючи портальне і загальне коло кровообігу, і тим самим прямо або опосередковано бере участь в усіх обмінних процесах організму. Багатогранність функцій обумовлює специфічну уразливість печінки під впливом ендо-і екзогенних факторів, тому патології печінки зустрічаються досить часто [62, 63, 73].

З іншого боку, численні літературні дані переконливо стверджують, що однією з основних ланок механізмів ураження гепатобіліарної системи, зокрема запального та дистрофічного характеру, є гіперліпопероксидація [96, 122].

За нестачі багато ненасичених жирних кислот утворення ефірів загальмовується, що спричинює відхилення в обміні холестерину і розвитку жирової інфільтрації.



Встановлено, що синдром ліпідної пероксидації, який розвивається за умов надмірного накопичення мембран альтернуючих продуктів перекисного окиснення ліпідів, включає такі патологічні зміни, як пошкодження мембранних ліпідів,

ліпопротеїдів і білків, інактивацію ферментів, що призводить до зрушень структурно-функціональної організації мембран клітин, у тому числі — гепатоцитів [101].

Відомо, що із лінолевої, ліноленової, арахідонової та інших ненасичених жирних кислот утворюється велика група гормонів — простагландинів.

Із фосфоліпідів під дією фосфоліпази утворюються багатоненасичені жирні кислоти, які в подальшому під впливом спе-цифічної ферментної системи в мікросомах піддаються окиснювальній циклізації, з утворенням молекул простагландину за певною схемою [42]. Гормони групи простагландинів впливають на численні фізіологічні процеси в організмі. Передусім вони діють на активність аденілатциклази, яка регулює в клітинах вміст АМФ- посередника між гормонами і ферментами. Так, у жировій тканині під дією цього ферменту підсилюється ліполіз, у м'язовій — глікогеноліз, у корковій речовині наднирників — стероїдогенез.

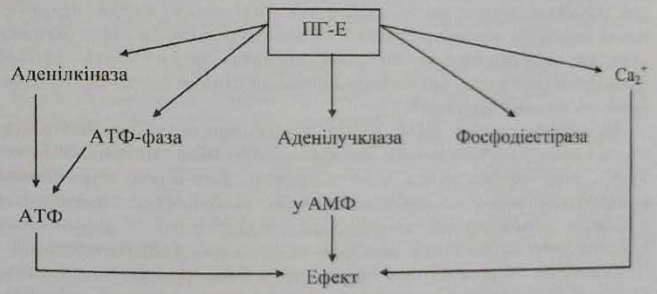


Рис. 5. Біологічна дія простагландинів

У клітинах протогландини перебувають у зв'язаному стані, їх дія активується адреналіном. Важливу роль у здійсненні дії простагландинів можуть відігравати АТФ та іони Ca_2^+ (рис. 5).

Простагландини впливають і на обмін ліпідів. Зокрема, вони гальмують активуючий вплив адреналіну на ліпазу жирової тканини, затримуючи тим самим розщеплення жирів, що є однією з причин ожиріння, тобто простагландини запобігають ожирінню.

Простогландини є також важливими регуляторами обміну кальцію, зокрема у м'язовій тканині, і завдяки цьому відіграють

певну роль у регуляції скорочення та розслаблення м'язів. Ці гормони мають важливе значення і для формування функцій статевого апарату.

6.3. Вплив лецитину на перебіг реакції пероксидного окиснення біомолекул в організмі тварин за оксидативного стресу

Вільнорадикальні реакції в організмі в нормі залучені до багатьох фізіологічних процесів, наприклад до антимікробного захисту в активованих фагоцитах, вазодилятації та перенесення електронів у дихальному ланцюгу [36, 128]. Завдяки первинним (природним) радикальним сполукам відбувається синтез таких біологічно активних речовин, як простогландини, тромбоксани, лейкотрієни та стероїдні гормони.

За нормальних умов, процес пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) виконує роль фізіологічного модулятора проникності мембран завдяки здатності ліпопероксидів зменшувати ступінь гідрофобності та збільшувати родинність їхньої фосфоліпідної фази, регулюючи у такий спосіб активність мембранозв'язаних ферментів.

За норми процес ПОЛ чітко контролюється ферментативними і неферментативними антиоксидантними системами організму, тому інтенсивність його незначна. Але в разі порушення метаболізму через оксидативний стрес відбувається посилення процесів пероксидації ліпідів, внаслідок чого є порушення властивостей біологічних мембран та функціонування клітин.

Реакціям пероксидного окиснення біомолекул належить, згідно із сучасними уявленнями, провідна роль у розвитку процесів ушкодження клітин [109]. Вважають, що основним біохімічним механізмом активації вільнорадикальних процесів під час ушкодження організму стресами є реакції окисного дегалогенування чужорідної молекули за участю цитохром Р-450-залежної монооксигенази системи ендоплазматичного ретикулума печінки з утворенням вільно радикальних продуктів та активних форм кисню (АФК), які стимулюють реакції пероксидації біомолекул — ліпідів, білків та нуклеїнових кислот [66].

Шкідлива дія на біологічні мембрани ланцюгового вільно радикального окиснення ліпідів відбувається внаслідок окиснення толових груп білків, зокрема інактивації іоно-транспортувальних ферментів, таких як Ca^{2+} — АТР-аза, збільшення іонної

проникності мембран, утворення мембранних дефектів і водних пор та зниження електричної стабільності ліпідного шару, що призводить до електричного самопробою мембран, утрати на них потенціалів і, як результат, їхніх бар'єрних функцій [9, 125].

Відомо, що однією з важливих властивостей мембран, до складу яких входять фосфоліпіди, є підтримання гомеостазу, транспорт іонів та особливо протонів для збережен-ня кислотноосновної рівноваги по обидва боки від мембрани [65, 69, 124].

В еритроцитах окиснювальна модифікація білків спричинює порушення структурно-функціональної організації еритроцитарної мембрани, внаслідок чого знижується їхня стійкість до дії кислотного гемолітика та підвищується неспецифічна проникність, що вірогідно є одним із провідних механізмів розвитку гіпоксичних змін у тканинах [125, 126].

Збільшення рівня активованих форм кисню може спричинити модифікацію біологічно важливих молекул, тому генерація АФК у клітині врівноважується їхнім знешкодженням і рівень цих оксидантів є відносно низьким (10^{10} та 10^{8} м) [15, 53, 115].

Дані про пряму залежність між станом системи антиоксидантного захисту і здатністю організму до адаптації наведено в роботах численних дослідників [31, 32, 46].

Багаторічні дослідження свідчать про значну роль у формуванні захисних ефектів адаптації стреслімітувальних систем, до яких належать і антиоксидантна система [46, 58].

Ланка антиоксидантних реакцій в механізмі захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вони запобі-гають не тільки розвитку вільнорадикальних реакцій, накопи-ченню супероксид-аніонів та перекисів, але й підтримують ви-соку активність окисно-відновних процесів, забезпечують елімінацію кінцевих кисневих метаболізмів із залученням їх до енергетичного обміну і активації процесів синтезу [52, 54, 59, 60].

Резистентність організму тварин залежить від розвитку і функціонування імунної системи та чинників зовнішнього середовища: годівельних, екологічних, техногенних.

Погіршення екологічної ситуації, збільшення кількості стрес-факторів та інших антропогенних чинників негативно впливає на стан здоров'я тварин [26, 30]. Все це сприяє прогніченню природної резистентності, зниженню продуктивних

якостей тварин, розвитку імунодефіцитних станів, у результаті яких організм не здатний виробляти необхідну кількість антитіл для боротьби з інфекційними хворобами [60, 90, 121].

Відомо, що стабільність набутого імунітету залежить від стану імунної системи, під дією якої стимулюється синтез імуноглобулінів, природних антитіл, міогенів для імунокомпетентних клітин, активність клітин фагоцитарного ряду [46, 49].

Стан, за якого внаслідок дії будь-яких чинників генерація вільнорадикальних форм кисню зростає більше, ніж потужність антиоксидантних систем, дослідники визначають як оксидативний стрес [32, 101, 102]. Унаслідок його дії відбувається підвищення інтенсивності утворення продуктів вільнорадикальних перетворень у всіх клітинних компонентах (рис. 6), які проявляють деструктивний вплив на ультраструктуру клітинних мембран і органел [95].

Значне підвищення інтенсивності вільнорадикального окиснення може відігравати важливу роль у розвитку деструктивних процесів і синдрому ендогенної інтоксикації. Активація ПОЛ і накопичення проміжних продуктів обміну в клітинних мембранах провокує зміну ліпідно-білкової взаємодії в них з подальшим порушенням процесів проникності та виходом продуктів метаболізму в екстрацелюлярний матрикс [11, 58, 105]. Згодом відбувається активація (через фактор Хагемана) серинових протеїназ, що супроводжується збільшенням концентрації продуктів незавершеного метаболізму, які мають токсичну й імуностресову дію.

Основою ліпідного матриксу мембран клітин є поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), що входять до складу фосфоліпідів і зумовлюють структурні та функціональні властивості мембран. Фосфоліпіди на поверхні клітинної мембрани становлять ідеальну мішень для вільнорадикальних процесів. Ненасичені вільні кислоти утворюють безперервні ліпідні фази в мембранах клітин. Наявність двох властивостей — високої реакційної здатності за рахунок послабленого зв'язку С–Н, сусіднього з подвійним зв'язком, та безперервність ліпідної фази роблять НЖК субстратом ланцюгового вільнорадикального окиснення у живому організмі.

Окиснення ліпідів викликає незворотні зміни або пошкодження структури мембран, порушення їх проникності для різних іонів і, як наслідок, посилення гемолізу еритроцитів, а також зміну їх реологічних показників [99, 116].

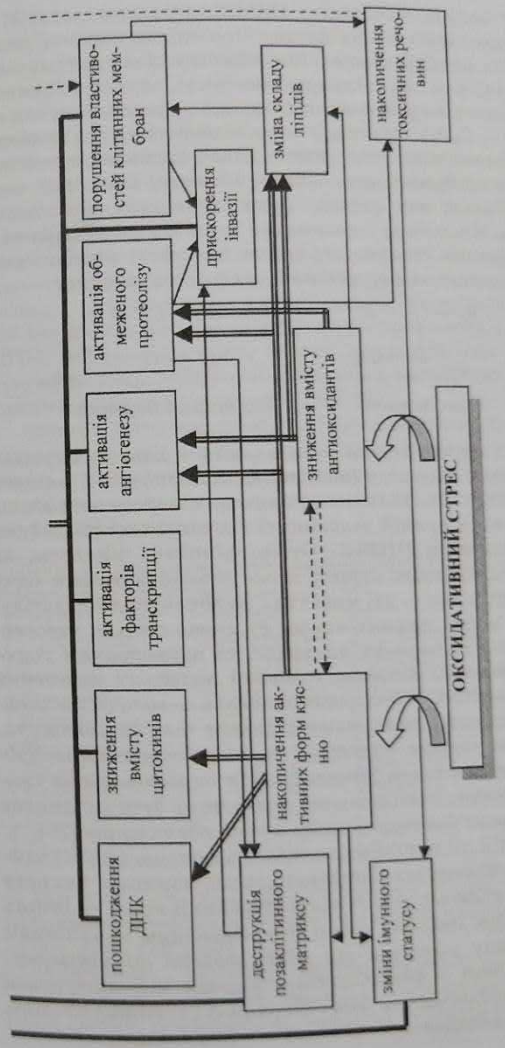
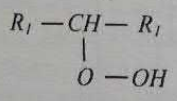
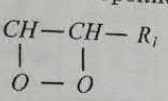


Рис. 6. Вплив оксидативного стресу на різні ланки обміну речовин

Першим етапом окиснення ПНЖК є дегідрування її з відщепленням одного атома водню. При цьому кислота перетворюється на вільний радикал. Вільним радикалом називається група атомів, яка має вільну валентність, здатну активно реагувати з іншими речовинами (наприклад радикал метил — CH_3, бензил — C_6H_5). Це дегідрування відбувається під впливом ферменту ліпоксидази. Утворення вільного радикалу зумовлює перебудову всієї біомолекули жирної кислоти, внаслідок чого подвійні зв'язки, які раніше були ізольованими, стають спряженими. Кислоти із спряженими подвійними зв'язками є дуже реактивними сполуками, які за наявності кисню окиснюють з утворенням гідроперекису і циклічного перекису:



Гідроперекис



Циклічний перекис

Перекиси і гідроперекиси розкладаються далі до окремих уламків жирного альдегіду (наприклад капронового), малонового діальдегіду та ін. Кількість утвореного малонового діальдегіду перебуває в прямій залежності від кількості подвійних зв'язків у молекулі ПНЖК. Отже, лінолева кислота, за наявності оксидативного стресу, може утворити тільки одну молекулу, ліноленова — дві молекули малонового діальдегіду.

Окиснення інших жирних кислот супроводжується утворенням токсичних і мутагенних альдегідів та підвищенням гідрофільності біомолекул. Зокрема, головний метаболіт окиснення 1,6-арахінової кислоти — 4-гідроксинониналь — володіє цитотоксичною і мутагенною дією, може зшивати білкові молекули, викликаючи порушення структури та інактивацію ферментів [112, 123]. Незбалансована інтенсифікація окиснювальних процесів за участі кисню (оксидативний стрес) може бути викликана дією екстремальних факторів різноманітного походження [28].

Ушкоджуючій дії активних метаболітів кисню (АМК) протидіє багатокомпонентна антиоксидантна система захисту організму, яка включає також захисні функції крові та інших біологічних рідин. Завдяки добре урівноваженим механізмам захисту організму токсична дія АМК зведена до мінімуму. У здоровій клітині у фізіологічних умовах підтримується оптимальне співвідношення між генерацією і знешкодженням АМК за дії антиоксидантної системи.

Висока реакційна здатність і токсичність АМК вимагає постійного функціонування в організмі спеціальних механізмів регуляції їх концентрації. Ці механізми спрямовані у першу чергу на гальмування процесів вільнорадикального окиснення біомолекул і мають вирішальне значення у забезпеченні життєдіяльності організму [25].

Механізм вільнорадикального окиснення в організмі підпорядкований загальним закономірностям ланцюгової реакції окиснення, де в ролі ініціатора, як правило, виступає гідроксильний радикал [31].

Оскільки ОН-радикал найсильніший із відомих окиснювачів і володіє надзвичайною біологічною дією, то його утворення в цих реакціях стає визначальним фактором токсичної дії кисню. Гідроксильні радикали спричиняють пошкодження ДНК, фібринолектину, інших макромолекул і клітинних структур [85], ініціюють утворення органічних радикалів і таким чином запускають ПОЛ [108].

Високі цитотоксичність і мутагенність ОН-радикалів роблять актуальним пошук засобів захисту від їх дії (табл. 6). Як бачимо з наведених даних, лецитин, як добавка кормова, є достатньо специфічним біологічним інгібітором ОН-радикалів.

Таблиця 6 — **константи швидкості взаємодії ОН-радикалу з різними сполуками у водних розчинах**

Сполука	Константа, $м^{-1}с^{-1}$	Сполука	Константа, $м^{-1}с^{-1}$
Каталаза	$2,6\ 10^{11}$	Аскорбат	$7,2\ 10^{9}$
Гемоглобін	$3,6\ 10^{10}$	Дезоксирибоза	$3,1\ 10^{9}$
Сироватковий альбумін	$2,3\ 10^{10}$	Етанол	$7,2\ 10^{8}$
Гуанін	$1,0\ 10^{10}$	Лецитин	$5,0\ 10^{8}$
Глютатіон	$8,8\ 10^{9}$	Метанол	$4,7\ 10^{8}$
Фенол	$4,2\ 10^{9}$	F^{3+}	$2,5\ 10^{8}$
Тимін	$3,0\ 10^{9}$	H_2O_2	$4,5\ 8^{8}$

Система антиоксидантного захисту регулює інтенсивність радикалоутворення та потреби організму в радикалах кисню та їх похідних [76, 109].

Встановлено, що зміна жирнокислотного складу клітинних мембран, унаслідок споживання тваринами ПНЖК рослинного походження, позитивно вплинула на їх стійкість до перекисних

процесів через пригнічення утворення вільних радикалів і посилення ферментної ланки антиоксидантного захисту [71].

За даними багатьох авторів [64, 91, 103, 119], підвищення вмісту ПНЖК у мембранах клітин призводить до зменшення утворення вільних радикалів і посилення ферментної ланки антиоксидантного захисту, зокрема підвищення активності антиоксидантних ферментів — каталази і супероксиддисмутази.

Лінолева, ліноленова, ейкозапентаєнова та докозагексаєнова — ненасичені жирні кислоти, які є складовими лецитину, здатні конкурентно заміщувати арахідонову кислоту у фосфоліпідах клітинних мембран. Наслідком такої зміни у жирнокислотному складі фосфоліпідів є зниження ступеня ризику утворення продуктів ПОЛ, оскільки лейкотрієнам і тромбоксинам, що утворюються з цих кислот, на відміну від продуктів метаболізму арахідонової кислоти, притаманна не лише менша біологічна активність, а й інша спрямованість біологічних ефектів [83, 99, 108, 118].

Цей унікальний сформований механізм має важливе значення під час захисту від окиснення біополімерів клітин і міжклітинної рідини, оскільки в них або послаблене, або відсутнє ферментальне розщеплення перекисних сполук, які можуть проникати крізь клітинні мембрани [26]. Велике значення для ліквідації цих порушень має застосування нових біологічних регуляторів метаболічних процесів, яким є лецитин.

Складові лецитину акумулюють і депонують енергію, виконують захисну роль, входячи в склад зовнішнього покриву тварин, складають основу ряду біологічно активних сполук, є джерелом незамінних жирних кислот, активують імунні реакції.

Лецитин виконує лікувальну та профілактичну функцію, сприяє підвищенню продуктивності сільськогосподарських тварин. Він є екологічно чистим, безпечним за технологією виробництва та застосування, не викликає побічних реакцій, не має протипоказань до застосування.

7. ФІЗИКО-БІОХІМІЧНІ І ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ КОРМІВ З ЛЕЦИТИНОМ У ТВАРИННИЦТВІ

7.1. Ефективність використання лецитину в раціоні свиней

Тип годівлі свиней пов'язаний із регіональними особливостями кормовиробництва і характеризується структурою раціону, тобто процентним співвідношенням окремих груп кормів за поживністю [4].

З метою підвищення конверсії зернових кормів і проблемних складових раціонів, сприяння травленню та зростання продуктивності свиней застосовуються різноманітні кормові добавки.

Свині — тварини скороспілі, плодовиті. Відносно короткий термін поросності (114–117 діб) і висока плодовитість маток (у середньому 8–12 поросят у гнізді) дозволяють одержувати від них за два опороси протягом року біля 20 і більше поросят, приріст живої маси яких за цей період в умовах повноцінної годівлі може досягнути 2,0–2,5 т.

Біологічна особливість свиней — інтенсивність обмінних процесів в організмі. Молодняк швидко росте, а дорослі свині відкладають у тілі переважно жир у вигляді сала, на утворення якого (порівнюючи з білком) витрачається велика кількість енергії.

За повноцінної, збалансованої за всіма показниками годівлі свині ефективно використовують енергію раціону. Наприклад, відгодівельний молодняк свиней в середньому 30–35% енергії раціону резервує в організмі у вигляді білка і жиру, 35–40% витрачає на підтримку життя і 25–30% припадає на втрати енергії в калі і сечі.

У практичних умовах протеїнову годівлю свиней нормують за вмістом у раціоні сирого і перетравленого протеїну, за концентрацією в ньому лізину, метіоніну і цистину. Вміст інших незамінних амінокислот у кормах, як правило, забезпечує по-требу свиней.

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
«ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ»
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

НДІ «МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ПРОБЛЕМ»

ДЗ «ДМА МОЗ України»

НЕЙРОТРОПНИЙ ЕФЕКТ ЛЕЦИТИНУ

Дніпро
2019

УДК 615.214:591.512:591.571
ББК 51.81я73
Д 75

Дроздов О. Л., , Свіргун І. С., Сілкіна Ю. В. , Шульга С. М.

«Нейротропний ефект лецитину». Дніпро: ЧМП «Економіка». 2019 . – 172 с.

Рекомендовано до друку Вченою радою Дніпропетровської медичної академії (протокол № 5 від 20.12. 2019 року).

Рецензент: докт. біол. наук, проф., зав. кафедрою екології та охорони навколишнього середовища Днепр. держ. аграрно-економ. ун.-та, В.І.Чєрная.

На підставі комплексних поведінкових, хроматографічних, імунофермент них, морфологічних та морфометричних досліджень вперше була визначена наявність у лецитину нейротропної дії. Цей біологічний ефект розгортається паралельно з широковідомими його гепатотропною та кардіопротекторною властивостями, які найяскравіше виявляються в умовах моделювання печінкової недостатності із застосуванням тетрахлорметана. Зазначена нейротропна активність лецитину характеризується перешкодженням розвитку поведінкових проявів нейротоксичної дії чотирьоххлористого вуглецю, загобіганням пригніченню рухливості, дослідницької, безумовно-рефлекторної активності, виявляючи виразний антиамнестичний ефект і сприяючи перебігу захисної інстинктивної поведінки по розпізнаванню новітніх обставин в якості безпечних.

Лецитин соняшника на першу добу застосування, викликає вагоме зростання рівня адреналіна, що співпадає із збідненням пулів ВМК і тут. На 14 день експерименту лецитин соняшника додатково істотно збільшував вміст DA та DL-Phe, але зменшував серотонінну і НА при співставленні з ефектами лецитину сої.

Двотижневе застосування лецитину сої в умовах отруєння CCl_4 призвело до збільшення приблизно на третину вмісту гідрокортизону в крові на перших (3-7 дні) етапах спостережень з подальшою (на 14 добу) його нормалізацією в порівнянні з ефектами ТХМ. Лецитин соняшника, як і лецитин сої, в перші 3-7 діб сприяв збільшенню, а на 14 день - зменшенню вивчаємого показника.

Застосування в умовах інтоксикації CCl_4 лецитину сої або соняшника призводить до вірогідного скорочення площі надниркників на 7-14 добу спостережень за рахунок зменшення коркової їх частини та, переважно, ширини клубочкової і пучкової її зон. Тоді, як ширина сітчастої зони КН, залишається істотно збільшеною ніж у інтактних щурів, але меншою ніж при отруєнні ЧХВ.

Співставляючи біологічні властивості лецитина соняшника з найрозповсюдженішим лецитином сої було визначено, що він не тільки відрізняється більшим вмістом фосфатиділхоліна і фосфатидних кислот та зменшеним рівнем фосфатиділетаноламіна, тригліцеридів і вільних жирних кислот, а також наявністю низки особливостей фармакологічного впливу. До них належать істотніші, ніж у лецитина сої, антидепресивна, ноотропна активності та здатність стабілізувати захисну інстинктивну поведінку. Такий ефект, вірогідно, обумовлений вагомішими: а) зростанням вмісту адреналіну та дофаміну і b) зменшенням концентрацій серотоніна, норадреналіна, естрадіола і прогестерона. Більш виразний ефект лецитину соняшника на жіночі статеві гормони, імовірно, обумовлений найсталішим його впливом на морфометричні характеристики ендокриноцитів сітчастої зони кори надниркових залоз.

ISBN 978-966-2637-65-6

© Дроздов О.Л., , Свіргун І. С.,
Сілкіна Ю. В., Шульга С. М. 2019

ЗМІСТ

ВСТУП 6

ГЛАВА 1. ВПЛИВ ЛЕЦИТИНУ НА ПЕРЕБІГ НЕРВОВО-ГОРМОНАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ.... 13

1.1. Фізіко-хімічні властивості та застосування Л в суміжних з медициною сферах господарства..... 14

1.2. Фармакологічні та фармакотерапевтичні властивості лецитинів 22

ГЛАВА 2. Визначення дії лецитину на показники нервової та гормональної активності..... 32

2.1. Вплив лецитину на показники стану когнітивних функцій ЦНС в умовах нейротоксичної дії тетрахлоретану..... 32

2.1.1. Зміна поведінки щурів при двотижневому застосуванні Л в умовах інтоксикації CCl_4..... 32

2.1.2. Вплив лецитина на фоні отруєння CCl_4 на відтворення енграм пам'яті у щурів..... 40

2.1.3. Вплив лецитину соняшника на захистний інстинкт у щурів в умовах інтоксикації тетрахлорметаном..... 44

ГЛАВА 3. Вплив лецитинів на концентрацію біогенних моноамінів та продуктів їхнього метаболізму в умовах інтоксікації ЧХВ..... 50

3.1. Вплив лецитину на рівень стероїдних гормонів в умовах інтоксикації ЧХВ..... 61

3.1.1. Зміни рівня кортизолу в сироватці крові при отруєнні тетрахлоретаном..... 62

3.1.2. Вплив лецитину на вміст загального тестостерону в крові білих щурів 68

3.1.3. Зміни концентрації естрадіолу в сироватці крові при підгострому введенні ЧХВ..... 72

3.1.4. Вплив лецитину на рівень прогестерона в крові щурів при інтоксикації CCl_4..... 76

ГЛАВА 4. Вплив лецитина соняшника на гістологічну структуру ЦНС та надниркових залоз в умовах отруєння ЧХВ..... 82

4.1. Стан морфологічної «архітектури» головного мозку щурів при застосуванні Л при інтоксикації CCl_4..... 83

4.2. Вплив Л на гістологічні та морфометричні показники стану надниркових залоз при

89

використанні тетрахлорметана..... 85
ГЛАВА 5 ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ НЕЙРОТРОПНИХ ЕФЕКТІВ ЛЕЦИТИНА РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ЧОТИРЬОХХЛОРИСТИМ ВУГЛИЦЕМ.....
ЗАКЛЮЧЕННЯ..... 123
РЕКОМЕНДАЦІЇ..... 127
СПИСОК НАЙВАЖЛИВІШИХ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... 128

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DDS - drug delivery system, високоефективна система доставки ліків;
EPL - есенціальні фосфоліпіди;
EE - обсяг інкапсуляції, encapsulation efficiency;
ZP - зета-потенціал;
КД - когнітивний дефіцит;
КП - когнітивні процеси;
КФ - когнітивні функції;
Л - лецитин (-ни);
Лс - ліпосоми;
ЛП - ліпопротеїди;
ЛПВП, α-ЛП, HDL - ЛП високої щільності;
ЛПНП, β-ЛП, LDL - ЛП низької щільності;
ЛПОНП, пре β-ЛП, VLDL - ЛП дуже низької щільності;
ЛППП -ЛП проміжної щільності;
LCAT - лецитин-холестерин ацетілтрансфераза;
LS - лецитин сої;
LSF - лецитин соняшника;
ЛЗ - лікарський (-і) засіб (-би);
ЛР - лікарська (-кі) речовина (-ни);
ЛФ - лікарська (-кі) форма (-ми);
НП , НР- ноотропні препарати, ноотропні речовини;
НД - ноотропна дія;
П - пам'ять;
ЛГ - лютеінізуючий гормон;
NMDA - N –метил – D – аспартат;
PG - простагландин (-ни);
ФХ, PC - фосфатиділхолін (-ни);
ФЛ, PL- фосфоліпіди;
ФЄА, PEA, PE – фосфатиділетаноламін;
ФС, PS - фосфатиділсерін;
ФИ, PI - фосфатиділінозітол;
Х - холестерин;
ХА - хвороба Альцгеймера;
М (М1-, М2-) - мускаринові (М1, першого; М2, другого типу) – холінорецептори;
ЕП - енграма (-ми) пам'яті;

90

Статистичну обробку результатів для кількісних показників проводили з урахуванням t-критерію Стьюдента (А. А. Халафян, 2009;), для якісних – шляхом зіставлення радіан показників (В. Н. Турчин, 2012;),також обробка даних проводилась за допомогою персонального, комп'ютера з використанням програмних продуктів STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний № AGAR909E415822FA) та Microsoft Excel (Microsoft Office 2016 Professional Plus, Open License 67528927).

ГЛАВА 1. ВПЛИВ ЛЕЦИТИНУ НА ПЕРЕБІГ НЕРВОВО-ГОРМОНАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

Насамперед, потрібно зазначити, що під терміном "лецитин " розуміють : а) фосфатиділхолін (-іни) (ФХ, РС) на початку вивчення діпальмітоіл- ФХ, пізніше РС з різними жирнокислотними ланцюгами; в) суміш, в першу чергу, похідних, sn- гліцеро-3-фосфату (L- α -гліцерофосфату) тобто фосфоліпідів (ФЛ, PL), до яких належать: фосфатиділхолін (ФХ, РС), фосфатиділетаноламін (ФЄА, PEA), фосфатиділсерін (ФС, PS), фосфатиділінозітол (ФИ, PI), діфосфатиділгліцерин (кардіоліпін) та сфінгомієлін [61, 62]. До її складу входять (як головні інгредієнти) гліцерофосфоліпіди (до 50 %) та тріацилгліцериди (близько 34%), істотно менше міститься гліцерогліколіпідів та вуглеводневих (цукроподібних) речовин та т. зв. мінорних компонентів (напр., стеролів та фітостеролів, вітамінів, вільних жирних кислот та інш.) [63, 66, 106 тощо]. Вивченню властивостей цієї суміші, отримуємої з насіння сояшника (LSF), присвячено наше дослідження. Розпочинаючи аналіз властивостей Л треба зазначити, що в наш час застосування лецитину сої набуло

широкого розповсюдження в споживчих, суміжних з медициною галузях діяльності.

1.1 Фізіко-хімічні властивості та застосування Л в суміжних з медициною сферах господарства.

Застосування Л, отриманого з сої, в наші часи, набрало масового характеру і розповсюджено в усьому світі, щорічна потреба в ньому досягає 180 тис. тон, вартість цього продукту перевищує 1,5 млрд. доларів США [64, 131].

Аналіз питомої ваги використання Л в різних сферах господарства показав, що на долю: 1) харчової промисловості: а) для виробництва маргаринів і майонезів використовується його 25-30 %; b) для хлібобулочних виробів, печива, вафель та інш. – 10-15 % [88] с) для шоколаду, морозива, кремів – 10-15 % [62, 64]; 2) в кормовій промисловості – 25-30 % [127-129]; 3) в фармацевтичній промисловості – 7-10 % [130,131]; 4) під час виробництва технічних продуктів – 7-10 % [132, 133]; 5) в косметичній промисловості – 3-5 % [64].

Споживча вартість лецитину визначається наявністю в нього интенсивних поверхнево-активних властивостей. на поверхні розділу фаз, які утворені двома рідинами, що не змішуються, Л виступає в якості емульгатора, який зменшує поверхневий натяг. В разі потреби у взаємодії між твердою та рідкою фазами Л виявляє змащувальні та диспергуючі властивості. Під час використання згаданої речовини між твердими фазами Л володіє змащувальними та/або вивільняючими (попередження налипання до форм) властивостями [132-135].

Широкого використання Л набув у парфумерній промисловості. Завдяки поверхнево-активним властивостям, суміш застосовується під час виробництва шампунів, лаків для нігтів, засобів для укладки зачісок, догляду за тілом, губної помади та інш. як у флаконах, так і в аерозольній формі. При цьому була визначена низька токсичність суміші PL [62-64].

Визначення кормових властивостей Л була проведено наприкінці XX - на початку XXI ст. на цілій низці свійських тварин (свині, телята, вівці), птиці (курчата, кури несучки, гуси, перепілки), а також в рибництві [64, 136, 137].

Введення Л стимулює приріст ваги свиноматок, посилює анаболічні процеси в організмі поросних тварин, а у підсисних свиней збільшує в сироватці крові концентрації загального білка, альбумінів та γ-глобулінів. Застосування Л соняшника в раціоні поросних (в останні 30 діб) і, в подальшому, у підсисних свиноматок викликало зростання середньодобового приросту та нівелювало вплив на поросят стрес-факторів. За результатами досліджень, внесення Л до комбікорму для годівлі молодняку свиней (60-120 денного віку) великої білої породи приводить до стабільного росту ваги тіла, збільшує в сироватці крові рівень глюкози, кальцію та фосфору, підвищує перебіг метаболізму білка та виявляє гіпохолестеринемічну активність. Аналіз якості свинини тварин, які отримували раціон з Л, показав зменшення вологи, збільшення вмісту кальцію і фосфору, інтенсивності кольору і мармуровості, покращення смакових якостей м'яса і зростання його стабільності при зберіганні.

Введення в раціон кур-несучок кросу «Белая» LSF (по 0,30—0,35 % до маси комбікорму) збільшує масу яєць і яєчну продуктивність птиці, а також покращує якість яєць. В цих умовах в

жовтках зростає відносний вміст фосфоліпідів при зменшенні концентрації холестеролу. Згодовування курчатам-бройлерам 0,3 мас % Л як в стартовий, так і у фінішний період росту підвищує рівень природної резистентності, покращує кальцифікацію кісток, посилює анаболічні і білоксинтезуючі процеси, що викликає стабільне прискорення приросту живої маси. У фінішному періоді підвищується значення сприяння Л кращому засвоєнню корму і підвищенню м'ясної продуктивності птиці. Близький до цього вплив оказував LSF у гусок (в концентрації 0,35 % мас %) і перепілок (по 0,25-0,30 мас %) [131, 137].

При вирощуванні молоді риб (канального сома, малазійського сома коропа, форелі та бестеру) [138] введення лецитину (0,5-0,7 мас %) до згодовуваного їм комбікорму сприяло збільшенню їхньої живої маси та підвищенню збереженості поголів'я в середньому на 25,0 %. Зростання виходу їстівної частини тіла риб, кількості еритроцитів і вмісту загального білка було визначено, зокрема, у лускатих коропів, на фоні пригнічення перебігу перекісного окислення ліпідів в печінці та скелетних м'язах риб [131].

Аналогічні властивості виявляв LS та його похідні в умовах вирощування комах для їстівних потреб [139].

Т.ч., Л, LS і LSF виявили себе як кормові домішки, які покращують зростання тварин, птиці і риби та збільшують харчову цінність, отримуємих м'яса, яєць та їстівних частин риби.

З вищезазначеного терміну Л використовується в харчовій промисловості в якості домішки природничого походження, що виявляє емульгуючі та антиоксидантні властивості [64,141,142]. Лецитин соняшника здатен ефективніше ніж Л сої чинити стабілізуючий вплив на утворення маргаринової емульсії. Під час

випікання хліба або здоби добавка лецитину по 0,3-0,5 % від маси полегшує підйом жирного тіста, дає можливість застосовувати збіднене клейковиною борошно, а також отримувати збільшений об'ємний вихід продукту. Отриманий хліб характеризувався: розвиненою рівномірною пористостю, збільшеним об'ємним виходом, світлішим кольором м'якушки. У виробництвах вафельного листа, цукрового печива, вафельних стаканчиків для морозива при застосуванні Л готові вироби мали поліпшену розсипчасту структуру, золотистий (підрум'янений) кольор (печиво), рівномірне забарвлення листа та хороший хрускіт [79, 141, 142].

Особливістю сьогоднішнього використання Л в харчовій промисловості являє собою зміна уваги з поліпшення споживчих властивостей їжі на її нутріцевтичну [91, 143] та лікувальну [144] цінність.

Ця закономірність розповсюджується на отримання компонентів [145] та збереження олії [146-152], спредів [153] та протеїнових емульсій [154] які широко застосовуються в виготовленні соусів, заправок, десертів, морозива, супів та домішок, поліпшуючих засвоєння їжі [148,151]. Вивчається можливість застосування Л для отримання масляно-водної емульсії кави [88], шоколаду [61, 89] або безкофеїнового зеленого чаю, як системи доставки катехінів [90].

Поряд з визначенням особливостей приготування їжі із застосуванням соняшникової олії [84] визначається її та LSF здатність вилучати фенол вміщуючи компоненти з різних овочей [85].

В якості одного з основних трендів розвитку харчової галузі визнано [86, 155] підвищення, за рахунок застосування LSF, стабільності до перекисного окислення *l*-ліноленової,

ейкозапентаноєвої та декозогексаноєвої ω-3 поліненасичених жирних кислот рослинних [87], тріскової та риб'ячої олій [92, 156-159, 162], які, попри всі складнощі їх отримання, зберігання та використання, широко застосовуються вегетаріанцями, віганами, а також в низці релігійних культів та виявляють кардіопротективний, антиатеросклеротичний, протипухлинний та інш. фармакологічні ефекти [90, 160, 161].

Особливе місце в цій галузі займає створення харчових та медичних систем доставки жиророзчинних вітамінів, зокрема, Е [93, 94]. До складу цього вітаміна входять: токофероли (α-, β-,γ- і δ – токофероли) та токотрієноли (α-,β-,γ- і δ – токотрієноли) [С59], які виявляють малу водну розчинність та низьку хімічну стабільність (до впливу кисню, світла та повітря). Такі недоліки частково компенсуються застосуванням α- токоферола ацетата, а також створенням низькоенергетичних наноемульсій [94, 164]. Останні зберігають активні форми вітамінних компонентів [165], підвищують їхню біодоступність [166] та ефективність, на разі, в комплексному лікуванні ракових пухлин [93-95,163]. Стабілізовані Л протеїнові емульсії, емульсії або мікроемульсії з рослинних або риб'ячих жирів також знайшли своє застосування, в якості харчових домішок, при харчовій алергії [91], ішемічній хворобі серця та гіпертензії [92].

Таке широке використання ЛС викликало появу в значній кількості його побочних ефектів. Найчастіше серед них зустрічаються: а) харчова алергія (на яку в США страждає понад 15 млн. людей) серед причин якої у дорослих продукти, отримані з сої займають 1 місце [65,66]; b) погладшання та фемінізація, викликані впливом фітоестрогенів сої (напр., геністеіну та/або нарінгеніну); с) прояви токсичності до них належить, наприклад, діарея яку викликає

Л, отриманий з яєчних жовтків [167]; та d) підвищені реологічні властивості генетично модифікованих сортів сої, рису тощо [61]. Виникнувше останнім часом становище викликало істотні законодавчі обмеження використання Л, яке розпочалося в США (Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004; Public Law 108-282) і згодом поширилося на інші країни [64, 67, 68, 96].

Подібні ризики викликали пошук Л іншого походження, які поки що позбавлені алергічних властивостей: з каноли [69], рису [70] і, особливо, соняшнику [71]. Одночасно, розробляються як нові, інноваційні методи отримання Л [72-75], так і методи контролю його якості (хроматографічні, масс-спектрометричні, NMR-спектроскопічні та інш.) [76-78, 168].

Разом з цим, вивчення застосування соняшникової олії, як сировини для отримання лецитину соняшнику, показало його істотне відставання від сої, рапсу або бавовни [71].

Розпочинаючи з другої половини XX сторіччя комплекс EPL привертає увагу фармацевтичної промисловості, як засіб покращення функції печінки, що завершилася появою ЛЗ групи «Ессенціале» (та їх генерічних аналогів) в капсульній та ампульній лікарських формах [64, 134]. В подальшому, як вище зазначено, більшу увагу привернули: a) розробка нормативних документів по використанню природного або синтетичного Л [64, 67, 68 96]; і b) замість традиційних ЛФ, створення, із застосуванням Л, високоефективних систем доставки ЛЗ (drug delivery system, DDS). До складу DDS увійшли: системи заміщення шкіри та фрагментів кісток [97-100], органогелі [101-103], емульсії [104, 105] та ліпосоми [104-113]. Створення на основі полі(□- капролактону), з використанням низьких концентрацій LS, волоконних DDS, прискорює проліферацію та

диференціацію різних типів клітин, включаючи низько диференційовані мезенхімальні клітини, що залишилися в кістках дорослих [98-100]. Комбінація желатину або ситостеролу з Л привела до появи органогелів для трансдермальної доставки метронідазолу або ібупрофену [101-103]. В якості мікроемульсій для перорального вживання були запропоновані DDS з β-каротином [104] та комбінацією амфотеріцину та парацетамола [105].

Але найбільшу увагу привертають до себе ліпосоми (Лс), як лікарська форма з найпоширенішою сферою застосування. Вивчення фармацевтичних властивостей Лс дозволило виділити основні їхні характерні показники: розмір часток, зета- потенціал (ZP), обсяг інкапсуляції ЛЗ (encapsulation efficiency, EE) та спроможність до вивільнення ЛР [109, 169-173], які мають індивідуальний характер як для класів ліпосом, так і для конкретних ЛЗ.

Раніше згадувалося про підвищення харчової доступності вітаміну Е, але треба треба додатково наголосити про створення з ним Лс (на основі Л) з діаметром часток d_{32}~120 нм для профілактики широкого кола хвороб [93, 163]. Із застосуванням LS, були розроблені Лс з кальція фосфата та індометацина, з використанням синтетичних жирів, які мали подовжений термін перебування у розчині [107]. Зіставлення придатності LS і LSF для виготовлення Лс з екстрактом бузини показало, що Л сої приводив до утворення стабільнішої суспензії з діаметром часток 205 нм та ZP збільшеним до – 36,4 мВ але малою EE (25%) [35], тоді як LSF істотно збільшував останній показник.

Перспективним вважається створення ліпосомальних ЛФ для протибактеріальних лікарських засобів. Розробка Лс форми ізоніазіду для лікування туберкульозу (на який в 2015 р. захворіло 10,4 млн., а

померло 1,8 млн. осіб [173]) із застосуванням LS та бентоїна показала можливість утворення такої суспензії [169-172, 174]. Для неї були притаманними діаметр часток 813,00±9,21 нм, ZP= -42,80±4,31 мВ, ЕЕ – 79,0±2,45% та зростання біодоступності, розповсюдження по організму та метаболізм ЛЗ. Ліпосоми з тімололом або евгенолом, утворені з Л та лауринової кислоти, мали сферичні наночастки діаметром 100 нм та виявляли антилістеріальну, протиколіінфекційну та антитоксоплазматичну активність [1, 110, 114]. Амфотерицин В в Лс для лікування грибкового кератиту утворює частки діаметром 161,9-230,5 нм, має ZP= +26,6-38,3 мВ, ЕЕ – 70%-75% з паралельним підвищенням біодоступності та часу прекорнеального знаходження ЛЗ і зменшенням болючості інстиляцій [108]. Доведено ефективність використання ліпосомальних форм етопозиду [3] та епігалокатехіна – галата [175] як протипухлинних засобів.

В Україні наукове вивчення отримання, властивостей і можливостей застосування Лс було розпочато в 80 роках XX століття і пов'язано, насамперед, з діяльністю київської (Г. В. Бєлік, Г. С. Григор'єва, О. В. Стефанов та інш.) та харківської (нач. з Ю. М. Краснопольским) груп дослідників. Їхні паралельні та сумісні зусилля ще в 1991 р. привели до створення першої в світі зареєстрованої Лс ЛФ лікарського засобу «Ліпін», а згодом Ліподоксу, Ліоліву, Ліпофлавону, а також квертецина в ліпосомах [64]. Зазначені ЛЗ виявляють мембрано- та гепатопротекторну активність, кардіотрофічну дію та прискорюють заживлення тканин очей.

Визначення можливостей створення лікарських форм із застосуванням Л та його пенетрантних властивостей [106] послужило скісним підґрунтям до відкриття його здатності покращувати вилучення та зберігання життєво здатних сперматозоїдів [114, 176-

179] різних свійських тварин (кіз [180, 181], овець [178, 182-186], биків [187], агуті [188] тощо). Здатність підвищувати фертильність сперматозоїдів у Л пов'язують з його включенням до клітинних і субклітинних мембран [189], підвищенням мітохондріальної активності [190], а також з пригніченням перекисного окислення ліпідів та явищ апоптозу [189, 191].

Т.ч., наприкінці цього розділу ми можемо прийти до висновку, що Л набули широкого розповсюдження в сільгосподарчій, харчовій, косметичній та фармацевтичній галузях, що викликало появу низки їхніх ускладнень та пошук безпечних різновидів лецитину.

1.2. Фармакологічні та фармакотерапевтичні властивості лецитинів

Притаманні Л біологічні властивості були розлого наведені в цілій низці узагальнюючих публікацій, деякі з котрих були виконані в нашій лабораторії [59, 63, 64].

Вивчення фармакологічних властивостей Л з самого початку призвело до формування уявлень про значну і різноманітну біологічну роль, яку виконує суміш провідних PL як сої так і соняшнику.

В першу чергу, до них належить здатність EPL, особливо тандему PC і PE, розподіляючись вздовж поверхні клітинних мембран, не тільки підтримувати їхню морфологічну структуру [192, 193], а і регулювати щільність, збільшувати проникність для іонів, низько- та середньо молекулярних речовин, утворювати мембранні

комплекси з білками та брати участь в регулюванні рівня вторинних месседжерів, наприклад, фосфатиділінозітолу або Ca^{+2} [194-196].

Обом видам Л притаманна гепатопротекторна активність, що виявляється у включенні ФЛ до мембран клітин печінки, заміщенні дефектів та відновленні бар'єрних властивостей ліпідного бішоя в умовах інтоксикації гепатотропними ядами [197]. Одночасно зростають стабільність мембранних білків, аеробне окислення [198], антиоксидантна та жовчогінна активність [199], при збідненні пулу загальних ліпідів печінки і LDL крові [200]. Зазначений вплив пов'язують, насамперед, з антиоксидантною дією Л, а не з замісним ефектом PL [201]. Порівняльна характеристика LS і LSF показала, що їхній гепатотропний ефект містить в собі попередження розвитку токсичної гіпертрофії печінки і зростання активності трансаміназ (АлАТ і АсАТ), стимуляцію поліплоідізації та процесів ділення гепатоцитів, підвищення об'єму ядер та кількості двоядерних клітин печінки і, нарешті, зростання кількості контактів гепатоцитів і відновлення нормальної морфологічної структури цього органа [202-205].

Особливу увагу привертає до себе участь Л в ліпідному метаболізмі і, насамперед, в утворенні, разом з аполіпопротеінами (апо), насамперед, групи А (апо А-І та апо А-ІІ) HDL [206]. Зазначений біологічний ефект визначає особливу роль ФЛ в патогенезі атеросклерозу [120,121], інфаркту міокарда [207], цукрового діабету II типу з дізметаболічними проявами [123], атероми [118], а також в процесах кишкового ліполізу та утворення хіломікронів [125].

Експериментальне вивчення впливу LS і LSF на перебіг гіперліпопротеідемії II типу у щурів, викликаною застосуванням

тетрахлорметану, показало його істотну наявність [201, 203]. В цих умовах LSF виявляє гіпохолестеринемічний ефект по відношенню до загального холестерину (Х), Х HDL та Х LDL. На відміну від LS, Л соняшника, запобігаючи схудненню тварин, не чинить анаболічної дії.

Істотну увагу до себе привертає активність лецитин-холестерин ацетілтрансферази (LCAT, КФ 2.3.1.43), її участь (разом з аполіпротеіном А-І) в утворенні ліпопротеінів високої щільності та її конкретні механізми [115-119]. Функція LCAT полягає в переносі жирної кислоти з положення 2n-PC до 3-ОН групи холестерину з утворенням його етерифікованої форми та лізофосфатиділхоліну [121]. Було визначено, що гіпоферментемія LCAT супроводжує зменшення рівня етерифікованого та збільшення концентрації вільного холестерина та PC в плазмі крові [63, 119].

В підсумку дослідження були спрямовані, як вже зазначалося, на встановлення місця цих зрушень в патогенезі атеросклерозу [120, 121], інфаркту міокарда [207], при цукровому діабеті II типу [123], атероми [124], а також в кишковому ліполізі та утворенні хіломікронів [125]. Було визначено, що токсоплазматична LCAT, на відміну від ферменту ссавців, перетворює PC на лізофосфатиділхолін, який виступає в якості чинника паразитарної інвазії [1].

Визначення тонких механізмів взаємодії LCAT з аполіпротеіном А-І, при утворенні HDL, показало особливу роль домену L^{159}-L^{170} та його частини («solar flare» region) Pro^{165}, Tyr^{166}, Ser^{167}, та Asp^{188} в якій критичну роль відіграє залишок тирозину [119, 118, 208, 209].

Разом з цим, важливу роль функцію виконує Л в синтезі простагландинів (PG), наприклад, PGQ_2, PGH_2, PGE_2, PGF_{2a}, PGD_2, які

приймають участь в регуляції температури тіла, процесів сну, формуванні ноцицептивних почуттів, диференційовки нервових клітин та інш. [210].

Здатність PL змінювати фізико-хімічні властивості і, в наслідку, проникність мембран тромбоцитів приводить до підвищення чутливості згаданих клітин крові до агрегуючих агентів, активує фактор III системи зсідання крові і вивільнення тромбоцитактивуючого фактора, що змінює стан системи гемостазу в цілому [211-213].

Істотним біологічним ефектом Л являє собою участь в тканинному диханні, здатність збільшувати рівень ліпопротеїдів високої щільності (антиатерогенних), підвищувати всмоктування жиророзчинних (A, D, E і K) вітамінів та утворення їхніх біологічно активних форм. Остання згадана властивість розповсюджується також на водорозчинні вітаміни групи B [62].

Порівняльне вивчення біологічних властивостей визначило, що як LS, так і LSF належать до IV класу токсичності (практично не шкідливі сполуки), не виявляють подразнюючої дії на слизові оболонки та шкіру [63, 64].

Однією з властивостей LSF, на відміну від LS, являє собою здатність вдвічі активніше підвищувати проникність лікарських засобів через біологічні бар'єри (слизові оболонки та шкіру), тобто виявляти пенетрантну дію [106]. В поєднанні з низькою токсичністю, це створює додаткові можливості для розробки фармацевтичною промисловістю як традиційних (таблетки, капсули, суспензії), так і нетрадиційних (мікроемульсії, органогелі, DDS, ліпосоми тощо) лікарські форми.

Разом з цією низкою, притаманних Л, біологічних ефектів нашу увагу привернула наявність у нього нейротропної дії, в першу чергу, ноотропного ефекту [2, 17, 56, 58].

Як вище згадувалося, до перших класифікацій НР включали такі ЛР як рацетами, речовини, які змінювали холіно-, дофаміно- або ГАМКергічні нейромедіаторні системи, деякі вітаміни, їх похідні, психостимулятори, лікарські засоби, покращуючи мозковий кровообіг, гормони пептидного походження тощо. В подальшому розвиток уявлень про НР проходив завдяки виділенню ЛР з домінуючим мнестичним ефектом (cognitive enhancers) та нейропротекторів, що істотно поширило групу за рахунок антагоністів кальцію, антиоксидантів, нейроактивних амінокислот, лецитину та його компонентів, препаратів рослинного походження тощо [56].

Експерти Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я, в наш час, пропонують визначити ноотропні засоби, як, ті що чинять прямий активуючий вплив на процеси навчання, поліпшують пам'ять і розумову діяльність, а також підвищують стійкість головного мозку до агресивних впливів [55].

Сьогодні до складу цієї групи, разом з ЛР, входять рослинні лікарські засоби з їхніми домішковими формами, харчові функціональні продукти і харчові домішки, нутріцевтики, які в своїй більшості містять різні рослинні компоненти, вітаміни, жирні кислоти, фосфоліпіди, антиоксиданти, амінокислоти, мінерали тощо [2, 17, 58].

Істотним досягненням сьогодення являє собою визнання наявності в цій різноманітній групі ЛР 5 провідних фармакодинамічних механізмів ноотропної дії (НД) [17, 57]. До цих (визначених) процесів належать: 1) підвищення кровообігу мозку; 2)

зростання рівня попередників нейромедіаторів та функціонування їхніх систем в ЦНС; 3) підвищення інтенсивності реакцій енергетичного метаболізму в нервовій тканині; 4) відновлення функціональної активності нервових клітин; 5) зменшення вільнорадикального обміну та перекісного окислення ліпідів, а також пошкодження ними мембран нервових елементів.

До основних проявів НД належать покращення пізнавальних та мнестичних функцій, інтелекту, мотивацій, уваги та концентрації зусиль [2,56].

Останнім часом для боротьби з КД увагу привертають рослинні засоби: з цитрусів [214-222], куркуми [223], шафрану [224], жожоби [225], кратому (або кетуму) [226], анемонів [227] та інш.

Вивчення фармакодинаміки рослинних препаратів та їхніх діючих речовин (серед яких істотну роль відіграють алкалоїди та флавоноїди) показало, що вона принципово різниться. Нобілетін або тангеретин (провідні флавоноїди сімейства цитрусових) поліпшують КФ [217, 228, 229] в умовах деменції [214], хвороби Альцгеймера [215, 218, 219, 222, 234], її експериментального моделювання [235] або при хворобі Паркінсона [217, 220, 221, 234]. Виявлення нейропротекторної дії зазначених речовин в умовах патології [216, 230, 231] пов'язують з їхнім стимулюючим впливом на гіппокамп [232, 233], активацією в цьому мозковому утворенні дофаміно- та холінореактивних систем [221, 237], а також мітохондріальних процесів [236]. Треба підкреслити, що збільшення синаптичної пластичності, включаючи активацію утворення факторів прискорюючих транскрипцію, вважається важливим компонентом біологічної дії флавоноїдів [238]. Підсилення холінергічних механізмів також було виявлено при стимуляції мнестичних реакцій

екстрактом жожоби у експериментальних тварин і чоловіків, страждаючих на хворобу Альцгеймера [225].

Олігосахариди з хітозану, які в умовах моделювання хвороби Альцгеймера поліпшують процеси навчання і пам'яті та виявляють нейропротекторну дію [100, 239], крім стимуляції холінореактивних систем гіпокампа [240, 241], зменшують показники перекисного окислення ліпідів (наприклад, рівня малонового діальдегіду), але активують глутатіонпероксидазу та супероксиддісмутазу [239, 242]. Такий вплив добре узгоджується як з патогенезом, так і з існуючими напрямками лікування хвороби Альцгеймера [243, 244].

Інші механізми стимуляції КФ лежать в основі впливу алкалоїдів. Мітрагінін (алкалоід кратому) збільшує біоелектричну активність мезенцефалічної області, включаючи її ретикулярну фармацію, за рахунок активації дофамінових механізмів, починаючи з синтезу відповідної мРНК [226]. Анемозід А3, запобігаючий КД похилого віку, специфічно активує AMPA – тип глутаматних та, скісно, NMDA – рецепторів гіпокампу гризунів [227].

Лецитин, як складна суміш речовин, на відміну від інших класів НР має як тваринне, так і рослинне походження та дещо різниться в залежності від застосованої сировини [62, 63].

Особливістю складу Л являє собою поєднання гідрофобних (насамперед, ліпідних) з гідрофільними (фосфатними групами та вуглеводнями) компонентами. До цієї суміші речовин входять (як головні інгрідієнти) гліцерофосфоліпіди (до 50 %) та триацилгліцериди (близько 34%), істотно менше міститься гліцерогліколіпідів та вуглеводневих (цукроподібних) речовин та т. зв. мінорних компонентів (напр., стеролів та фітостеролів, вітамінів, вільних жирних кислот та інш.) [61, 66, 106 тощо].

Безпосередньому нейротропному впливу Л присвячено відносно небагато робіт.

В першу чергу, вони присвячені перспективі їх застосування при хворобі Альцгеймера, яка базується, по-перше на експериментально встановленому поліпшенні П, тестуємій у водяному лабіринті Моріса та підвищеному лабіринті в умовах моделювання захворювання на мишах [41]. Другим чинником цієї цікавості являє собою можливість РС виступати фактором запобігання холінергічному дефіциту як компоненту розвитку хвороби Альцгеймера [38, 39], хоча механізми поліпшуючої дії Л ще досліджуються [41, 245]. Застосування РС в умовах КД старих щурів скорочувало час пошуку зануреної платформи у водяному лабіринті Моріса, що автори пояснювали відновленням синтезу РНК для утворення мускаринових холінорецепторів першого типу [246]. Поєднання полісахариду фукоідану з лецитином, як в протеіновому коктейлі [243, 244], так і в ліпосомах [247], виявляло антиоксидантну активність [248], підвищувало біодоступність вільних (включаючи ω-3) жирних кислот та β-каротину [249], що покращувало КФ і функції серцево-судинної системи.

Ліпосоми з Л та екстрактом трилістнику [250] і, особливо, з екстрактами солодки, імбиру або майорану [251], з основною їхньою діючою речовиною флавоноїдом піноцебрином [252, 253], виявляють цілу низку біологічних властивостей. До їхніх фармакологічних ефектів належать: 1) наявність антиоксидантної активності [254, 255] за рахунок пригнічення перекісного окислення в мітохондріях; 2) покращення мозкового кровообігу [256, 257] та пришвидчення відновлення гематоенцефалічного бар'єра в постгіпоксичному

періоді [258]; 3) зменшення КД та розладів пам'яті у старих щурів та в умовах моделювання діабету [259, 260, 261] та інш.

В попередніх дослідах нашої лабораторії [262] показано, що як LS, так і LSF запобігають пригніченню рухливості, дослідницької та безумовно-рефлекторної активностей та зростанню емоційної напруги, викликаних інтоксикаційним стресом.

В основі оптимізуючого впливу Л на КП, на думку ряда авторів, лежить здатність РС виступати в якості прекурсора в синтезі ацетилхоліну [126], запобігати збудженню мускаринових холінорецепторів 2 типу (М2-ХР), яке викликає розлади П, і, за рахунок підвищення активності М1-ХР в корі головного мозку і гіпокампі, поліпшувати процеси навчання і пам'яті [263, 264]. Не виключено, що поліпшення КП НР в умовах хвороби Альцгеймера та деменції, викликаної розсіяним склерозом або хворобою Паркінсона, обумовлено здатністю пригнічувати холінестеразну активність [42]. Істотну увагу викликає роль, яку відіграють в поліпшенні КФ, інші медіаторні системи: дофамін- [226, 265, 266], ГАМК- [267, 268], глутамат- [269] та NMDA- єргічних [227].

В зв'язку з нейротропним ефектом Л увагу привертає їхня здатність сприяти утворенню функціонально активних, трансмембранних ліпопротеїдних комплексів [126], імовірно, із сприянням статевих стероїдів [269]. Скісно це знаходить підтвердження в здатності фітоестрогену LS нарінгеніну попереджувати розлади пасивного і активного уникання та П, тестуємої в радіальному лабіринті, в умовах моделювання хвороби Альцгеймера [270]. Інший фітоестроген сої геністеін поліпшував показники П в приподнятому лабіринті з харчовим підкріпленням, не впливаючи на рухливість та емоційний стан щурів [44].

Утворення трансмембранних ліпопротеїдних комплексів за участю компонентів Л було одним з факторів зростання актуальності визначення ролі епігенетичних [45, 271] та генетичних факторів в КП, КД і мнестичних реакціях. При цьому була визначена провідна роль в регуляції, наприклад, гіпокампальної синаптичної пластичності (одного з істотних чинників консолідації ЕП) сімейства генів невідкладного раннього реагування (immridiate early genes), до яких належать Zif 268, Arc, c-Fos та Fos B [272-275]. У мишей з дефіцитом Fos B порушувалися нейрогенез в гіпокампі і поведінка з поступовим розвитком епілептиформних нападів [276]. Виявлено тісну залежність між геном Fos B та антидепресивною активністю [277], стійкістю до стрессорних впливів [278, 279], анксіолітичною дією [280], поліпшенням навчання та пам`яті [265, 272, 274], включно з її імунологічною формою [281].

Т.ч., закінчуючи аналіз літературних даних по вивченню фармакологічних властивостей лецитинів можна прийти до висновку про наявність до них істотного інтересу в різних галузях господарства (аграрному комплексі: тваринництві та кормівництві, харчовій та косметичній промисловості, виготовленні змащувальних речовин і фарб тощо). В медико-біологічних дисциплінах визначення властивостей Л має значну актуальність як спосіб створення DDS, включаючи новітні лікарські форми (напр., ліпосоми) (в фармації), так і встановлення наявності та характеру їхніх (як Л, так і його ЛФ) фармакологічних ефектів.

В зв'язку з цим актуальним являє собою комплексне вивчення впливу Л, особливо LSF як однієї з природних монополій України [62], на стан когнітивних функцій та механізми їх нервово-гормональної регуляції.

Крім цього, треба зазначити, що вплив LSF як на стан КФ, так і їхні нервово-гормональні механізми (включно з концентрацією біогенних моноамінів, їхніх попередників і метаболітів, а також провідних груп стероїдних гормонів) потребують окремого комплексного дослідження.

ГЛАВА 2. ВИЗНАЧЕННЯ ДІЇ ЛЕЦИТИНУ НА ПОКАЗНИКИ НЕРВОВОЇ ТА ГОРМОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ

2.1. Вплив лецитину на показники стану когнітивних функцій ЦНС в умовах нейротоксичної дії тетрахлорметану

Стан нервової системи тварин в наших дослідженнях визначали за зміною поведінки щурів в тесті "відкрите поле", відтворенню умовної пасивно-захистної навички, збереженню захисного інстинкту та гістологічній будові головного мозку.

2.1.1. Зміна поведінки щурів при двотижневому застосуванні Л в умовах інтоксикації CCl_4.

Для визначення наявності нейротропної активності у Л нами були вивчені зміни когнітивних функцій мозку у щурів (поведінка, індивідуально набута та рефлекторна видова пам'ять) в умовах отруєння ЧХВ.

Зміни показників поведінки щурів на фоні дії досліджуваних речовин визначали в установці «відкрите поле» розміром 100 на 100 см з відстанями між «хибними» нірками 10 см. Горизонтальну рухову активність (ГРА) визначали за кількістю квадратів, що повністю були перетнені на протязі 3 хвилин, про дослідницьку вертикальну рухову

активність (ВРА) – за кількістю підйомів на задні лапи, про емоційну реактивність – за кількістю болюсів дефекації (КБД), про безумовно-рефлекторну діяльність – за числом обстежених нірок (НР). Поряд з цими показниками реєстрували тривалість груммінга (ТГр) (в секундах) під час тестування.

В експерименті було використано 3 групи лабораторних білих щурів. функціонування мозку, яких оцінювали за показниками поведінки, вимірюваними в тесті "відкрите поле". Вихідні показники в середньому по всіх групах щурів складали:

а) горизонтальна рухова активність - 24,8 ± 2,0 пересічених квадратів;

b) вертикальна рухова активність - 7,3 ± 1,0 підйомів на задні лапи;

з) тривалість груммінга - 12,9 ± 2,0 секунд;

d) кількість обстежених "хибних норок" - 3,5 ±0,3 штук;

е) кількість болюсів дефекації - 1,0 ±0,2 штук.

Зіставлення наведених даних з вихідним фоном кожної з досліджуємих груп показало відсутність статистично значущих відмінностей між ними. Цей факт робить отримані результати порівнюваємими і доводить можливість проведення їх порівняльного аналізу, оскільки всі групи належать до категорії нормального розподілу значень.

Використання ЧХВ приводило (Табл. 2.1) на 3 добу спостережень до істотного зниження на 52,7% кількісті обстежених "норок" і різкого збільшення (у 3,5 разу) числа болюсів дефекації на 7 день експерименту.

Найбільш виразні зміни поведінки експериментальних тварин визначалось на 14 добу досліджень.

У цей період тварини були млявими, із скуйовдженою шерстю, спостерігалася істотна втрата ваги, що свідчить про виразну інтоксикацію CCl_4. З боку поведінки виявлялося істотне зниження локомоторної (на 48,0%) і дослідницької активності (77,1%), тривалості груммінга (61,3%) і норкового рефлексу (на 80,6%). В цей самий час, залишалося статистично значущим зростання числа болюсів дефекації (на 140,0%), що, імовірно, свідчить про підвищений рівень неспокою у тварин.

Табл.2.1

Вплив чотирьоххлористого вуглецю на поведенку щурів в тесті "відкрите поле"

Серії спостер.	Стат. показники	Показники поведінки				
		ГРА[1)]	ВРА	Гр(сек.)	НР	БД
Вихідний фон	M	22,3	4,8	11,1	3,6	1,0
	±m	2,2	0,8	1,7	0,4	0,3
3 доба	M	22,6	4,4	7,7	1,7*	1,3
	±m	5,6	0,8	2,1	0,6	0,6
7 доба	M	34,6	4,0	6,9	3,0	4,5*
	±m	5,9	0,6	1,4	0,5	1,1
14 доба	M	11,6*	1,1*	4,3*	0,7*	2,4*
	±m	2,2	0,5	1,1	0,3	0,4

Примітки: 1) ГРА – горизонтальна рухова активність;
ВРА – вертикальна рухова активність;
Гр – тривалість груммінга в секундах;
НР – кількість обстежених "помилкових нірок";
БД – кількість болюсів дефекації;
* - $p < 0,05$ в порівнянні з вихідним фоном.

Аналіз наведених результатів визначення показників поведінки щурів при використанні ЧХВ свідчить, що нейротропний ефект інтоксикації виявляється (Рис. 2.1) в пригніченні всіх видів рухливості тварин і їх безумовно-рефлекторної діяльності, імовірно, за рахунок утруднення функціонування серотонінореактивних механізмів. В цей же час, під впливом CCl_4, починаючи з 7 дня спостережень, різко і стійко зростає неспокій тварин, про що свідчить збільшення кількості болюсів дефекації.

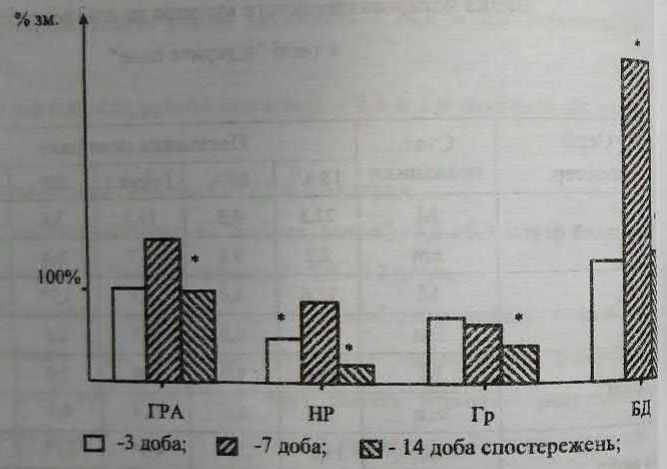


Рис. 2.1. Вплив чотирьоххлористого вуглецю на поведінку тварин.

Позначення: ГРА - горизонтальна рухова активність;
НР - норковий рефлекс;
Гр - тривалість груммінга;
БД - кількість болюсів дефекації;
• -p<0,05 в порівнянні з вихідними показниками.

Використання соєвого лецитину проводило до стабілізації, при зіставленні з вихідним фоном, показників поведінки тварин, що вивчаються, на всіх етапах експерименту (табл.2.2). Виключеннями є вірогідне, в порівнянні з вихідним фоном, зниження на 53,4% тривалості груммінга на 7 добу і збільшення на 58,7% кількості перетнутих щурами квадратів на 14 день, що відображає їх локомоторну активність.

Табл. 2.2.

Вплив соєвого лецитину на поведінку щурів в умовах інтоксикації чотирьоххлористим вуглецем

Серії спостережень	Стат. показники	Показники поведінки				
		ГРА[1)]	ВРА	Гр(сек.)	НР	БД
Вихідний фон	M	24,4	4,7	19,1	3,7	1,2
	±m	3,1	0,7	4,5	0,6	0,3
3 доба	M	31,3	4,3	20,7	5,6	1,1
	±m	4,0	0,7	3,7	1,0	0,3
7 доба	M	33,3	3,3	8,9*	3,2	1,1**
	±m	5,8	0,6	2,7	0,8	0,3
14 доба	M	38,7* **	5,4**	13,4**	3,1**	1,3
	±m	4,0	0,8	2,9	0,8	0,4

Примітки: 1) Позначення див. Табл. 2.1.;
* - p <0,05 у порівнянні з вихідним фоном;
** - p <0,05 при порівнянні з аналогічним періодом інтоксикації ЧХВ.

Проте, найбільш виразний характер ці зміни мала на 14 добу досліджень. За результатами спостережень, під впливом соєвого

лецитину статистично значуще, в порівнянні з ефектами ЧХВ, зростали горизонтальна (у 2,3 рази) і вертикальна (у 3,6 разів) рухова активність, тривалість умивальних рухів (у 2,1 рази) і кількість обстежених норок (у 3,4 рази).

В той же час, на 7 добу спостережень щоденне введення LS істотно на 75,6% зменшувало число болюсів дефекації. Зазначена тенденція зберігалася і наприкінці визначення біологічної активності даного лецитину.

Т.ч., лікувально-профілактичне використання соєвого лецитину в дозі 2,5 г/кг блокує нейротропні ефекти інтоксикації чотирьоххлористим вуглецем, стабілізуючи поведінку тварин. В цілому аналогічну дію на досліджуємі показники чинить щоденне вживання соняшникового лецитину (Табл. 2.3.).

Оцінюючи зміни зареєстрованих параметрів на тлі дії LSF під час спостережень потрібно ще раз підкреслити, що вони близькі до встановлених при використанні соєвого лецитину. Це повною мірою стосується вірогідного підвищення, в порівнянні з дією ЧХВ, горизонтальної (на 118,1%) і, особливо, вертикальної (у 7,6 разів) рухової активності, кількості обстежених «норок» (на 214,3%) і зниження кількості болюсів дефекації (на 66,7%).

Т.ч., соняшниковий лецитин, подібно до соєвого, при щоденному введенні по 2,5 г/кг маси тіла блокує нейротоксичний вплив CCl_4 на таку КФ мозку як поведінка. Це виявляється в запобіганні пригніченню рухливості (Рис. 2.2), дослідницької і безуслово-рефлекторної активності, а також в зменшенні неспокою тварин.

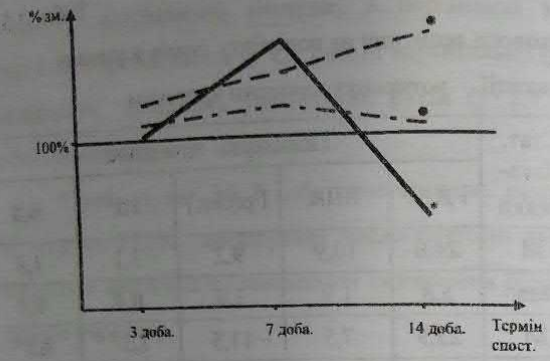
Табл. 2.3.

Вплив соняшкового лецитину на поведінку щурів в умовах інтоксикації чотирьоххлористим вуглецем

Серії спостережень	Стат. Пока-Зники	Показники поведінки				
		ГДА[1)]	ВДА	Гр(сек.)	НР	БД
Вихідний фон	M	24,0	10,9	9,2	3,1	1,5
	±m	3,8	1,9	3,0	0,4	0,4
3 доба	M	25,9	7,5	11,5	1,3*●	0,5*
	±m	3,4	1,3	2,9	0,4	0,2
7 доба	M	28,1	7,7	17,7	2,3	0,7**
	±m	5,4	1,7	2,8	0,3	0,3
14 доба	M	25,3**	9,5**	7,5	2,2**	0,8**
	±m	5,2	2,8	3,8	0,4	0,2

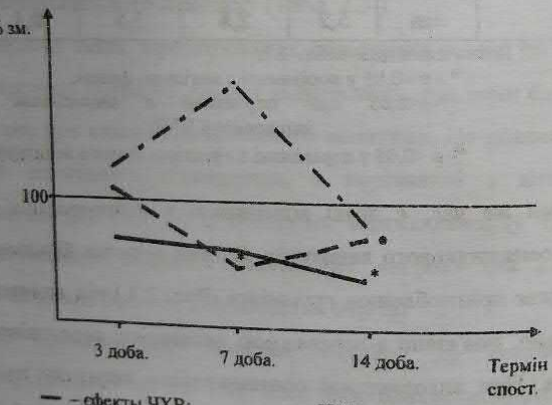
Примітки: [1)] Позначення див. Табл. 2.1;
* - p <0,05 у порівнянні з вихідним фоном;
**-p<0,05 при порівнянні з аналогічним періодом інтоксикації ЧХВ;
●- p <0,05 у порівнянні з ефектами соєвого лецитину.

В той же час, є деякі відмінності в нейротропних ефектах соєвого і соняшникового лецитинів. Соєвий лецитин більшою мірою перешкоджає пригнобленню груммінга (Рис. 2.3.) під впливом ЧХВ, що, імовірно, пов'язано з переважною активацією серотонінергічних механізмів. При використанні соняшникового лецитину на всьому терміні експерименту спостерігалося істотне, в порівнянні з CCl_4, зниження кількості болюсів дефекації (Рис. 2.4.), що відбиває зменшення неспокою щурів, пов'язаного із станом катехоламінореактивних систем головного мозку.



— – ефекти ЧХВ; – – · – ЧХВ+соєвий лецитин;
· · – – ЧХВ + соняшниковий лецитин;

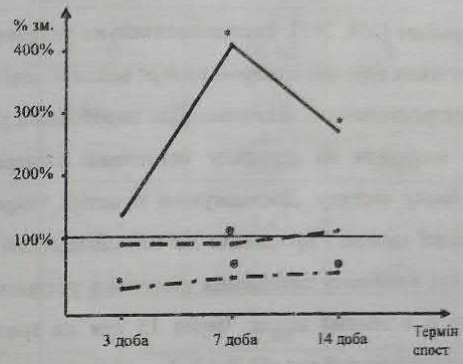
Рис. 2.2. Вплив соєвого и соняшникового лецитина на рухливість тварин.
Позначення: * – p < 0,05 по сравнению с исходным фоном;
● – p < 0,05 при сопоставлении с действием ЧХВ.



— – ефекты ЧХВ; – – · – ЧХВ+соєвий лецитин;
· · – – ЧХВ + соняшниковий лецитин;

Рис. 2.3. Вплив соєвого і соняшникового лецитинів на тривалість грумінга у щурів
Позначення: * - p <0,05 у порівнянні з вихідним фоном;
● - p <0,05 при порівнянні з дією ЧХВ.

Завершуючи аналіз відмінностей поведінкових ефектів соєвого і соняшникового лецетинів необхідно підкреслити той факт, що принципових відмінностей в їх нейротропних властивостях практично немає.



— – ефекты ЧХВ; – – · – ЧХВ+соєвий лецитин;
· · – – ЧХВ + соняшниковий лецитин;

Рис. 2.4. Вплив соєвого і соняшникового лецитинів на кількість болюсов дефекації.
Позначення: * - p <0,05 у порівнянні з вихідним фоном;
● - p <0,05 при порівнянні з дією ЧХВ.

Т.ч., вивчені лецитини перешкоджають розвитку поведінкових проявів нейротоксичної дії чотирьоххлористого вуглецю, запобігаючи пригнобленню рухливості, дослідницької і безумовно-рефлекторної активності, а також зменшуючи неспокій тварин.

енграм пам'яті у щурів

Про зміни пам'яті судили по умовній пасивно-захистній реакції. Умовну реакцію пасивного уникнення (УРПУ) виробляли на основі одноразового електрошкіряного підкріплення, неодноразово описаного раніше [264, 267]. Експериментальна установка складалася з двох сполучених круглим отвором камер: великої освітленої та малої темної з електрифікованою підлогою. Для вироблення умовної реакції (УР) щура поміщали на середину освітленої камери хвостом до проходу в темну частину. Досліджуючи простір, тварина знаходила отвір до темної камери і проникало до неї. Латентний період УРПУ охоплював час з моменту поміщення тварини в установку до повного переміщення її в темний відсік. Через 15 сек на ґратчасту підлогу камери подавали змінний ток (50 Гц, 2-3 с, 10 мс), величину якого для кожної тварини визначали індивідуально. За особиною, яка перебігла до освітленого відсіку спостерігали на протязі 3 хв. і, якщо вона не намагалася повернутися в темне приміщення, УРПУ вважалася виробленою в одному поєднанні. Тварин, які повторно зайшли в темну камеру протягом 3 хвилин, виключали з досліду.

Співставлення латентних періодів (Табл. 2.4 і 2.5) проникнення до темного відсіку як у амнезованих електрострумом (в подальшому) тварин, так і таких що зберегли УРПУ після електросудомного впливу в групах для визначення ефектів LS і LSF показало відсутність між ними істотних розбіжностей. Встановлення цього факту дозволяє провести порівняльний аналіз змін, викликаних обома лецитинами у відтворенні індивідуально набутого пам'ятного сліду.

Таблиця 2.4.

Вплив лецитина сої на відтворення УРПУ у щурів в умовах отруєння тетрахлорметаном

Серії досліджень		Тварини амнезовані		Тварини що зберегли УРПУ	
		% тварин з УРПУ	ЛП прон. до отвору	% тварин УРПУ	ЛП прон. до отвору
Навчання	M	0	16,62	0	13,15
	±m	-	2,19	-	1,57
Після ел.-шоку	M	0	* 11,04	100,0	0
	±m	-	1,43	-	-
30 хвил після застосування	M	** 33,3	** 34,55	** 25,0	27,33
	±m	-	1,86	-	4,60
7 доба після застосування	M	* ** 50,0	28,83	** 25,0	32,50
	±m	-	7,05	-	4,30
14 доба після застосування	M	* ** 67,0	** 27,00	** 30,0	69,00
	±m	-	3,47	-	6,10

Примітки: * - $p<0,05$ при співставленні з ЛП навчання;

** - $p<0,05$ по зрівнянні з ЛП після електрошоку.

Під впливом електроструму у тварин, що втратили УРПУ, час «заходу» до темної нірки вірогідно зменшувався на 33,9% (табл.2.4). Застосування LS вже через 30 хвилин проводило до відновлення

УРПУ у 33,3% ($p<0,05$) щурів і істотного подовження її ЛП на 107,9%. В подальшому антиамнестичний ефект цього Л зростав, досягаючи поліпшення відтворення навички у 67,0% ($p<0,05$) особин і збільшення терміну переміщення до темної камери лабіринту на 62,5% ($p<0,05$).

Інший вплив LS чинив на збереження енграм пам'яті у неамнезованих щурів. Істотне зростання згасання УРПУ по відношенню до впливу електроструму спостерігалося на 1,7 і 14 дні дослідів, коли зберігли умовну індивідуальну навичку відповідно лише 25,0%, 25,0%, і 30,0% тварин, а ЛП реакції мав тенденцію до зростання, але істотно не змінювався. Разом з цим, треба підкреслити, що такі зміни мали статистично значущу розбіжність з динамікою втрати пасивно-захистної реакції контрольною групою щурів тільки через 30 хв після застосування LS.

У амнезованих щурів Л соняшника викликав зрушення близькі до встановлених при застосуванні LS, з відновленням УРПУ в 1-й день у 11,1 %, а на 7 і 14 доби в середньому 47%-53%, що (в останніх випадках) істотно переважало вихідні та показники встановлені під впливом електроструму (Рис. 2.5.). На відміну від LS ЛП УРПУ при використанні LSF дещо зменшувався.

Особливістю біологічної дії LSF була наявність виразного ноотропного ефекту при співставленні як з вихідними, так і визначеними на фоні використання LS параметрами (Рис. 2.6.). За цих умов ЛП проникнення до темного відсіку лабіринту на 7 день істотно зростав в 3,5 рази по відношенню до процедури навчання і на 184,6% при зрівнянні з впливом лецитину сої.

При використанні LSF в умовах отруєння ЧХВ спостерігалися як зміни подібні до виявлених на фоні дії LS, так і істотно відмінні від них (табл.2.5).

Таблиця 2.5.

Вплив лецитина соняшника на відтворення УРПУ у щурів в умовах отруєння тетрахлорметаном

Серії досліджень		Амнезовані		Тварини , що зберегли УРПУ	
		% тварин з УРПУ	ЛП прон. до отвору	% тварин з УРПУ	ЛП прон. до отвору
Навчання	M	0	21,00	0	17,00
	±m	-	2,43	-	2,59
Після ел.-шоку	M	0	18,29	* ● 100,0	0
	±m	-	-	-	-
30 хвил. після застосування	M	11,1	20,18	* 71,4	* 11,00
	±m	-	4,14	-	0,71
7 доба після застосування	M	* ** 46,6	42,0	* 85,7	* ● 60,00
	±m	-	7,50	-	-
14 доба після застосування	M	* ** 53,3	* 13,64	* 71,4	68,5
	±m	-	1,52	-	15,27

Примітки: * - $p<0,05$ при співставленні з ЛП навчанням;
** - $p<0,05$ по зрівнянні з ЛП після електрошоку;
● - $p<0,05$ при порівнянні з впливом L.

Т.ч., Л обох рослин в умовах інтоксикації ЧХВ виявляє виразний антиамнестичний ефект, а LSF додатково, на відміну від LS, демонструє ноотропні властивості.

2.1.3. Вплив лецитину соняшника на захистний інстинкт у щурів в умовах інтоксикації тетрахлорметаном.

Для визначення стану захистної інстинктивної поведінки (ЗІ), враховуючи той факт, що у щурів здійснюється конкретне сприйняття навколишнього оточення [264, 267], нами використовувався кожен раз інший лабіринт, що складав, які попередній з 2 рукавів великого освітленого і меншого затемненого. Відмінностями цих лабіринтів, від використаного для вироблення УРПУ, було те, що: а) їх стіни були пофарбовані контрастніше; b) для тестування збереження ЗІ вони використовувалися тільки один раз; і с) проникнення до темного рукава, тобто реалізація захисного інстинкту гризунів, не супроводжувалося ноцицептивним впливом. Техніка визначення наявності ЗІ була за часом аналогічна встановленню збереження УРПУ. Запропонований нами модифікований підхід до оцінки співвідношення наявності індивідуально набутого пам'ятного сліду (УРПУ) та групової генетично закріпленої форми пам'яті (ЗІ) був оформлений у вигляді патенту України № 60146, дата пріоритету 10.06.2011 [264]. Через 2 години після вироблення пасивно-захистної навички і тестування ЗІ тварину через електроди, накладені на вушні раковини піддавали дії електроструму. Через 72 години, коли рухливість навчених щурів не відрізнялася від поведінки інтактних тварин, проводилася перевірка збереження умовної реакції і захисного

інстинкту. За її результатами виділялися тварини з амнезією навички та із збереженою УР, а також ті які втратили і виявляють ЗІ.

Через 3 години всім групам щурів внутрішньошлунково вводили ізотонічний розчин хлористого натрію, LS або LSF. Через 30 хвилин після цієї процедури у щурів знову тестували збереження УРПУ та ЗІ .

У гризунів спостерігається, як один з життєвих механізмів (разом з харчовою, статтєвою поведінковою та гібернацією), захистний інстинкт (ЗІ) ховатися до всілякої темної нори [264], що підвищує їх шанси на виживання при природних та біологічних загрозах. Т.ч, ЗІ належить до стародавніх видових спадкових когнітивних форм, наразі, пам'яті. В зв'язку з цим, ми вважали за доцільне визначити вплив на неї LS і LSF.

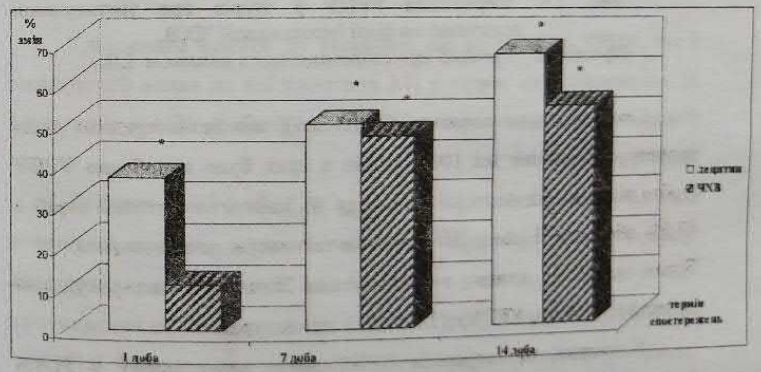


Рис. 2.5. Антиамнестичний ефект лецитина сої в умовах отруєння ЧХВ.
Примітка: *- $p<0,05$ при співставленні з впливом електрошока.

РОЗДІЛ 2
СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ ТРАНСПОРТНИХ НАНОСИСТЕМ (ЛІПОСОМ) З ФОСФОЛІПІДІВ ОЛІЇ СОНЯШНИКА

В розділі II представлено основні методи створення ліпосом (заморожування/танення, сонікації, екструзії через мембрани з розмірами пор 50 – 200 нм.). Одним з актуальних завдань є вибір оптимальної сировини для приготування ліпосом і спосіб їх отримання. Основними характеристиками ліпосом є розмір та об'єм внутрішнього водного простору (мл/г ліпіду). Показано, що SFL має необхідні складові для застосування як сировина в створенні ліпосом. Метод отримання ліпосомальної форми для певного фармацевтично активного інгредієнта можна визначити реально тільки експериментальним шляхом і з наступною перевіркою отриманих результатів за допомогою електронно сканувальної або атомно силової мікроскопії. Для створення ліпосомальної форми АТР визначено, що найкращий метод заморожування – танення (отримано великі одношарові везикули - LUV), а для ліпосомальної форми куркуміна – екструзія через мембрани (отримано малі одношарові везикули - SUV). Для визначення впливу температури і ініційованого окиснення на стабільність ліпосом використовували метод спінових зондів з детекцією характеристик методом ЕПР. Як спінові зонди застовували нітроксильні радикали - біс(1-оксил-2,2,6,6-тетраметил піперидин- іл-4-овий) естер 5,7-диметиладамантан-1,3-дикарбонової кислоти і комерційний препарат 16 -доксілстеаринової кислоти - 2-(14-карбокси тетра- децил)-2-этил-4,4-диметил-3-оксазоліндоксил і азоініціатор 2,2′-азобіс (2-метилпропіонамідін) дигідрохлорид. Для ліпосом із SFL значення часу кореляції обертальної дифузії є найбільшими на всьому температурному діапазоні, що відповідає найбільш «ускладненому» обертанню зонда, розчиненого в мембрані і свідчить про найбільшу жорсткість даних ліпосом і є додатковим підтвердженням їх більшої стабільності. Стабільність ліпосом різного походження до ініційованого окиснення визначали за зміною інтенсивності сигналу інкапсульованого

біradикалу в ліпосоми. Показано, що найбільшою стійкістю характеризуються ліпосоми, отримані з фосфоліпідів соняшника, оскільки інтенсивність сигналу ЕПР протягом часу експерименту не знижується, що свідчить про наявність природних антиоксидантів, що запобігають процесам окиснення. Такими антиоксидантами є хлорогенова кислота і токоферол.

2.1. Методи отримання одношарових і багатошарових ліпосом

УДК 547.953:615.012:665:372

ЛІПОСОМИ І НАНОСОМИ: СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ, ВИРОБНИЦТВО

С. М. ШУЛЬГА

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 02.06.2013

Ліпосоми — порожнисті частинки, вміст яких обмежено ліпідною мембраною. Належать до великого сімейства везикулярних (бульбашкових) структур, утворених амфіфільними молекулами. Ліпосоми, що складаються з одного або декількох бішарів фосфоліпідів, уперше було описано в середині 60-х рр. За порівняно короткий термін ліпосоми перетворились із простої моделі, що імітує клітинні мембрани, на об'єкт активних наукових досліджень і набули різноманітного практичного застосування. На сьогодні існує значна кількість лабораторних методик створення ліпосом і порівняно невелика кількість технологій, використовуваних у промисловості. Проте більшість цих методів мають обмеження за включення біологічно активних речовин у ліпосоми внаслідок чутливості останніх до механічних та/або хімічних ушкоджень. В огляді охарактеризовано структуру ліпосом, їхні властивості, методи створення та масштабування у промисловому виробництві.

Ключові слова: ліпосоми, фосфоліпіди, фосфатидилхолін, наносоми, везикули.

Історія успіхів у вивченні та практичному використанні ліпосом завдячує Бенгхему і його колегам, які на початку 1960-х помітили, що мазки з яєчного лецитину реагували з водою, утворюючи досить складні структури [1, 2]. Одержані структури було проаналізовано за допомогою електронного мікроскопа і з'ясовано, що спонтанно утворюється безліч везикул. Ці більш-менш однорідні ліпідні везикули спочатку було названо смектичними мезофазами [3], а згодом вони одержали більш благозвучну назву — ліпосоми [4]. У наступні роки ліпосоми використовували в основному як моделі для вивчення мембран, транспортних функцій і механізмів, властивостей проникнення (просочування), а також кінетики адгезії та злиття.

Незабаром ліпосоми було визнано перспективними об'єктами для систем доставлення лікарських засобів [5, 6] і з огляду на це дедалі більше досліджень проводили з метою застосування їх у медицині, косметиці, харчовій промисловості та сільському господарстві. При цьому основні напрями досліджень стосувалися використання у фармацевтиці, зокрема у її біотехнологічної галузі.

Термін «мікрокапсули» для визначення ліпосом або фосфоліпідних везикул (ФВ) було запропоновано в 70-ті рр. минулого століття. Пік розвитку цього напряму досліджень припадає на 80-ті рр., коли було запатентовано основні методи одержання різноманітних ФВ [7–9]. Деякі ФВ отримали спеціальні назви, наприклад «протеоліпосоми», «імуносоми», «віросоми» (останні використовують як штучні вакцини). Термін «фармакосоми» було запропоновано для ФВ із ковалентно приєднаними лікарськими речовинами, тобто з амфіфільними попередниками лікарських засобів [10].

Ліпосомальна частинка в класичному варіанті — це сферична структура (рис. 1).

Зовні ліпосоми не завжди виглядають як глобулярні частинки. Іноді вони набирають плоскої дископодібної форми (так звані дисками) або мають вигляд дуже довгих і тонких

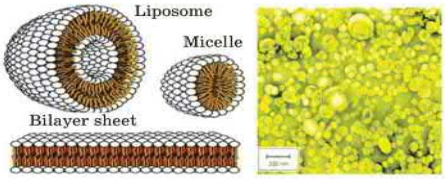


Рис. 1. **Зовнішній вигляд ліпосом (поперечний переріз)**

трубок, які називають тубулярними ліпосомами (рис. 2).

У разі включення в ліпосоми біологічно активних речовин (БАР) водна фаза вбудовується в порожнину везикули, а масляний екстракт — у її оболонку. Одна з причин уваги до ліпосом полягає у їхній здатності захоплювати як водорозчинні, так і жиророзчинні сполуки. Це дає змогу залучати у везикулярні структури як гідрофільні, так і ліпофільні інгредієнти, що утворюють суспензії у водному середовищі.

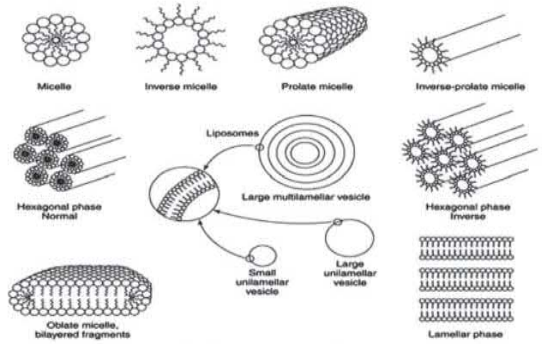


Рис. 2. **Різні види ліпосом**

На рис. 3 показано, як у водному розчині відбувається самозбирання мембран та замикання мембран з утворенням ліпідних пухирців — ліпосом.

Ліпосоми можна розділити на три основні групи: до першої входять ті, що складаються з фосфоліпідів (сої, яєчного жовтка, соняшнику, мозку великої рогатої худоби тощо), до другої — катіонні ліпосоми, утворені молекулами довголанцюгових аліфатичних амінів (С12 — С22), які містять дві або три гідроксильні групи. До третьої групи належать неіонні ліпосоми (ніосоми). Найчастіше це продукти взаємодії неіонних поверхнево-активних речовин (ПАР, зокрема тих, що мають поліоксіетиленові ланцюги) із холестеролом.

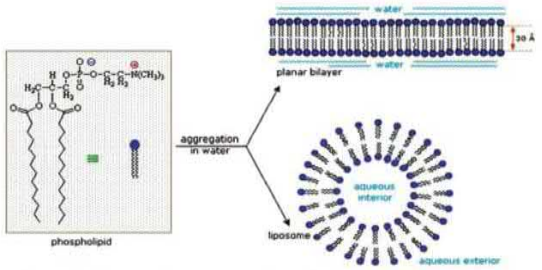


Рис. 3. **Самозбирання фосфоліпідних молекул у ліпідні везикули у водному розчині**

Мембрани ліпосом захищають інкапсульовані речовини від руйнування, поступово вивільняючи включені в них речовини і на певний час подовжують їх дію.

Ліпосоми із фосфоліпідів (фосфатидилхоліну) формуються відносно просто, а їхні суспензії зберігають стабільність упродовж тривалого часу зберігання. Підвищену здатність вмісту ліпосомальних композицій до проникнення можна пояснити не тільки особливою будовою ліпосомальних частинок, але й наявністю природних лецитинових фрагментів.

Для одержання ліпосом спиртовий розчин фосфоліпідів впорскують у великий об'єм водного розчину. Нерозчинні у воді фосфоліпіди утворюють дрібні бульбашки, стінки яких складаються з одного ліпідного бішару (одношарові ліпосоми). Можна спочатку висушити у пробірці розчин фосфоліпідів в органічному розчиннику (наприклад, хлороформі), додати у пробірку водний розчин і добре струсити. Ліпіди переходять в останній у вигляді багатошарових ліпосом (рис. 4). Використання фосфатидилхоліну у складі двошарових оболонок мікрокапсул забезпечує його найбільшу біодоступність.

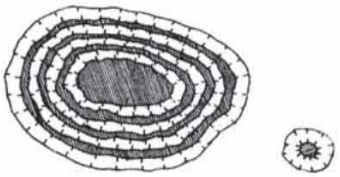


Рис. 4. **Структура багатошарової та одношарової ліпосом:**
заштриховані ділянки — місцезнаходження води, світлі — бімолекулярний ліпідний шар, «хвости» складових його молекул звернені всередину шару

Інші фосфоліпіди, що не утворюють ліпідних сфер, зазвичай використовують для модифікації заряду ліпосом. Фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидні кислоти та фосфатидилгліцерол сприяють електростатичному відштовхуванню, запобігаючи агрегації або злипанню ліпосом. Деякі ліпіди можуть бути залучені для модифікації амфіфільних агрегацій, що зумовлює зміну властивостей мембрани ліпосом. Так, холестерол підвищує жорсткість і зменшує проникність ліпідних бішарів, а лізофосфатидилхолін сприяє здатності ліпосом до проникнення.

Основними характеристиками ліпосом є розмір та об'єм внутрішнього водного простору (мл/г ліпіду).

Ліпосоми (умовно) можна класифікувати за структурою, методом одержання, складом компонентів і застосуванням (звичайні та спеціальні).

Класифікацію ліпосом залежно від структури наведено в табл. 1, від методу одержання — табл. 2, від складу компонентів та застосування — табл. 3.

Дрібні одношарові (моноламелярні) ліпосоми (SUV) відносно однорідні за розміром. Кожна ліпосома має тільки одну бішарову мембрану, що робить їх легкодоступними для водорозчинних молекул.

Зважаючи на те, що товщина зовнішньої мембрани є постійною (близько 3–5 нм), а діаметр SUV невеликий, водний об'єм їх істотно зменшується зі зменшенням розміру, що призводить до зниження здатності захоплення БАР. SUV зазвичай одержують шляхом ультразвукової обробки водних дисперсій фосфоліпідів. Потім везикули фракціонують за розміром методом гельпроникної хроматографії або центрифугуванням у градієнті гліцеролу. Інший метод приготування таких везикул полягає в швидкому введенні у водну фазу розчину ліпіду в етанолі. Окрім того, можна використовувати прес Френча.

Таблиця 1. **Типи везикул залежно від їхніх розмірів та кількості шарів ліпідів**

Тип везикул	Скорочена назва	Діаметр, нм	Кількість шарів ліпідів
Одношарові везикули	UV	Весь діапазон розмірів	Один
Малі одношарові везикули	SUV	20–100	Один
Середні одношарові везикули	MUV	100–150	Один
Великі одношарові везикули	LUV	100–500	Один
Гігантські одношарові везикули	GUV	Більше 1000	Один
Оліголамелярні везикули	OLV	100–1000	5
Багатошарові везикули	MLV	Більше 500	5–25
Мультивезикулярні везикули	MVV	Більше 1000	Мультиблокова структура

Великі одношарові (моноламелярні) ліпосоми (LUV) також мають одну зовнішню мембрану, але здатні захоплювати велику кількість водної фази. Проте їхня незначна механічна міцність може легко призвести до розриву мембрани і втрати вмісту внутрішньої сфери. Низькою є і здатність їх до утримання водорозчинних компонентів. Вибір методу одержання SUV залежить від ліпідного

Таблиця 2. **Методи одержання та формування везикул**

Методи одержання	Скорочена назва	Везикули
Прості чи оліговезикули, одержані за допомогою випарювання в оберненій фазі	REV	SUV/OLV
Багатошарові везикули, отримані випарюванням в оберненій фазі	MLV-REV	MLV
Стабільні багатошарові везикули	SPLV	SPLV
Багатошарові везикули, одержані методом заморожування–розморожування	FAT MLV	MLV
Везикули, отримані методом екструзії	VET	SUV/LUV
Везикули, одержані методом дегідратації–регідратації	DRV	OLV/MVV

Таблиця 3. **Класифікація ліпосом залежно від складу компонентів та застосування**

Тип ліпосом	Скорочена назва везикул	Склад
Звичайні ліпосоми	CL	Нейтральні або негативно заряджені фосфоліпіди та холестерол
Спеціальні ліпосоми	RSVE	Відновлений вірус Сендай
pH-залежні ліпосоми	–	Фосфоліпіди Фосфатидилетаноламін або діолеоїл-фосфатидилетаноламін
Катіонні ліпосоми	–	Катіонні ліпіди Діолеоїлфосфатидил-етаноламін
Довгоциркулюючі ліпосоми	LCL	Нейтральні фосфоліпіди, холестерол та 5–10% PEG — DSPE
Імуноліпосоми	IL	CL або LCL з додаванням моноклональних антитіл

складу везикул та їх призначення. Так, методи, за яких здійснюють розбавлення дисперсії, є непридатними для інкапсуляції лікарських препаратів, а з використанням органічних розчинників — не підходять для протеїнів.

Найчастіше для одержання SUV використовують такі:

А) Діаліз (або розбавлення) детергентних розчинів — найпопулярніший метод для біохімічних досліджень, оскільки він придатний для включення протеїнів у SUV, що утворюються. Ліпід (або ліпід із протеїном) диспергують з надлишком детергенту, а потім детергент видаляють різними методами залежно від значення його критичної концентрації міцелоутворення. Розмір ліпосом залежить не тільки від типу детергенту або ліпіду, але й швидкості видалення детергенту.

Б) Інфузія та обернено-фазове випаровування — методи, пов'язані з використанням неполярних розчинників. Однак для приготування модельних мембран, що містять протеїни, вони непридатні.

В) Методи злиття — це кілька підходів, що ґрунтуються на злитті SUV до утворення ліпосом більшого розміру. Наприклад, повторні операції заморожування–танення (придатні для реконструкції деяких мембранних протеїнів), використання Ca^{2+} для злиття SUV, які містять фосфатидилсерин.

Г) Додавання фосфатидилхоліну з короткими ланцюгами в кількості до 20% від загального вмісту ліпідів, при цьому мультиламелярні бішари перетворюються на стабільні LUV.

Д) Додавання жирних кислот або детергентів за певних умов спричинює злиття SUV з утворенням LUV і сприяє включенню протеїнів у бішар останніх.

Є) Швидка екструзія мультиламелярної дисперсії через полікарбонатні фільтри дає змогу одержувати LUV діаметром 600–1000 А і має низку істотних переваг.

Ж) Короткотривале підвищення pH сприяє утворенню везикул (як SUV, так і LUV) із молекул фосфатидної кислоти.

Багатошарові (мультиламелярні) ліпосоми (MLV), як правило, є наночастинками більш ніж із п'ятьма шарами. Оскільки їхні концентричні оболонки повільно руйнуються, MLV поступово вивільняють свій вміст. Значна кількість шарів забезпечує вищу здатність до утримання водорозчинних молекул порівняно з іншими типами ліпосом. Однак об'єм захоплення менший, ніж у LUV, оскільки кількість фосфоліпідів, потрібних для утворення численних бішарів, більша.

Олігошарові ліпосоми (OLV) — частинки, що складаються з декількох десятків і навіть сотень шарів, вони, як правило, менші, ніж MLV із кількома шарами. OLV поєднують відносно великі об'єм захоплення і утримувальну здатність, що є важливим для мікроінкапсуляції.

У водних системах із речовинами, що здатні утворювати ліпідні мембрани, можливі два варіанти асоціації речовин. Перший варіант пов'язаний з утворенням «істинних» ліпосом (рис. 1), другий — так званих наносом із ліпідів (nanosomes, niosomes і т. д.) — дрібних сфер діаметром 10–1000 нм, які не мають, на відміну від ліпосом, внутрішнього водного резервуара і відокремлені від зовнішнього водного середовища моношаровою ліпідною мембраною (рис. 5).

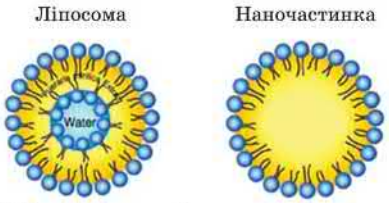


Рис. 5. **Схематичне зображення наночастинки (наносоми)**

Ліпідні наносоми можна собі уявити, якщо взяти звичайну емульсію типу «олію-воді» і замінити в ній олійні краплі на частинки твердого жиру.

Утворення таких частинок, мабуть, є енергетично доцільним, оскільки необхідність структурування (зниження ентропії системи) виявляється тільки в організації поверхневого ламінарного моношару, тимчасом як внутрішні молекули, що містяться у сфері, розташовуються хаотично.

Можна вважати [11], що наночастинки утворюються за інтенсивного фізичного впливу на ліпосомальні структури (наприклад, за допомогою ультразвуку), і ймовірність їх утворення збільшується зі зростанням відносного вмісту ліпідів у вихідній системі. Враховуючи, що наночастинки утворюються під час руйнування ліпосомальних структур, діаметр наночастинок буде значно меншим.

Окрім того, наночастинки, зміцнені полімерами, можна одержати у процесі полімеризації акриламіду, метилметакрилату, ефірів ціанакрилової кислоти або з використанням готових полімерів — альбуміну, поліефірів гідроксикарбонових кислот (молочної та гліколевої). Оптимальними

шляхами застосування суспензій наночастинок є ін'єкційне (наприклад, внутрішньосудинне) чи пероральне введення або у складі очних крапель [10,12].

Ліпідні наноконтейнери можуть бути двох видів: наночастинки або нанокапсули. Наночастинки — це монолітні, зазвичай сферичні, утворення, що містять БАР в об'ємі наночастинки або тільки на її поверхні. Виділення БАР з наночастинки відбувається поступово з контрольованою швидкістю: тільки з поверхні; з усього об'єму наночастинки внаслідок її розпаду або набухання. До наночастинок належать також нанокристали, які складаються тільки з БАР і подрібнені до відповідних розмірів, що дає їм змогу розчинятися зі швидкістю, вищою, ніж за розчинення частинок більших розмірів. Нанокапсули — це порожнисті сферичні контейнери (з товщиною стінки ~10–30 нм), що містять рідке середовище, в якому розчинена БАР. Вивільнення БАР з нанокапсули відбувається унаслідок дифузії через стінку або під час розриву капсули. Швидкість вивільнення регулюють дизайном нанокапсул і способом їх одержання.

Властивості ліпосом та їхня поведінка визначаються насамперед наявністю в них замкнутої мембранної оболонки. Незважаючи на молекулярну товщину (3–5 нм), ліпідний бішар відзначається механічною міцністю і гнучкістю. У рідкокристалічному стані його компоненти мають високу молекулярну рухливість, тому загалом мембрана поводиться як досить рідка, текуча фаза. Завдяки цьому ліпосоми зберігають цілісність за різних ушкоджень, а їхня мембрана має здатність до самовідновлення структурних дефектів, що виникають. Разом з тим гнучкість бішару та його плинність надають ліпосомам високої пластичності. Так, ліпосоми змінюють розміри і форму у відповідь на зміну осмотичної концентрації зовнішнього водного розчину. За сильного осмотичного стресу цілісність бішару може порушитись і ліпосоми можуть розпастися на частинки меншого розміру.

Для практичного застосування ліпосом і везикул важливою є їхня здатність включати в себе і утримувати речовини різної природи. Перелік таких речовин надзвичайно широкий — від неорганічних іонів і низькомолекулярних органічних сполук до протеїнів та нуклеїнових кислот. Так, наприклад, у роботі [13] показано високу ефективність ліпосом для солюбілізації речовин (таксолу і бетулінової кислоти), погано розчинних як у воді, так і в олії.

Хоча ліпосоми відносно міцні й стабільні, їх можна зруйнувати до міцелярного стану за допомогою ПАР, що належать до розряду детергентів. Цей процес (солюбілізація) є зворотним, і ліпосоми знову формуються, якщо детергент видалити з міцелярного розчину. Самозбирання мембран шляхом видалення солюбілізуючого детергенту зазвичай застосовують для вбудовування інтегральних мембранних протеїнів у ліпідний бішар (процес реконструкції). При цьому одержують протеїнвмісні ліпосоми — протеоліпосоми.

Іншою важливою властивістю ліпосом, що дає їм переваги перед іншими носіями БАР, є спорідненість із природними мембранами клітин за хімічним складом. Відомо, що ліпіди, які входять до складу мембран, займають від 20% до 80% їхньої маси. Тому за правильного підбору компонентів уведення ліпосом в організм не спричинює негативних реакцій.

Залежно від хімічних і фізичних властивостей ліпосом (складу, поверхневого заряду) вони вибірково поглинаються різними тканинами організму і навіть різними органами, тобто змінюється тропність ліпосом. Регулюючи тропність, можна спрямовувати діючу речовину в конкретні тканини і органи. У ліпосоми можна інкапсулювати сполуки, що легко окиснюються, чим істотно уповільнити їх деградацію і захистити кінцевий продукт від передчасного розпаду.

Хоча ліпосоми порівняно легко руйнуються в організмі, вивільняючи доставлені речовини, проте надійно захищають їх від контакту з імунною системою і, отже, не викликають захисних та алергічних реакцій організму.

Важливо, аби БАР надійно утримувалися в ліпосомі і разом з тим виходили (бажано з регульованою швидкістю) з неї у разі досягнення тканини або органа-мішені. Такі властивості мають ліпосоми з контрольованим вивільненням, наприклад термо- і pH-чутливі ліпосоми, що мають достатньо жорстку мембрану за нормальних (фізіологічних) умов, але з підвищенням температури (у разі термочутливих ліпосом) або зниженні pH середовища (для pH-чутливих ліпосом) проникність мембрани таких ліпосом різко збільшується.

Здатність ліпосомальних частинок деформувати свою структуру в процесі подолання мікрокапілярів є ще однією їхньою особливістю.

Численні дослідження показали, що ліпосоми активно реагують із мембраною

клітини [14–17]. При цьому важливу роль відіграє форма їх взаємодії, яка залежить від властивостей ліпосом (рис. 6).

Найпростіша форма взаємодії — це коли ліпосоми з БАР адсорбуються на поверхні клітини. Ліпосома може так і залишитись на поверхні, а може відбутися процес її поглинання клітиною (ендоцитоз) і разом з нею всередину клітини потраплять відповідні БАР.

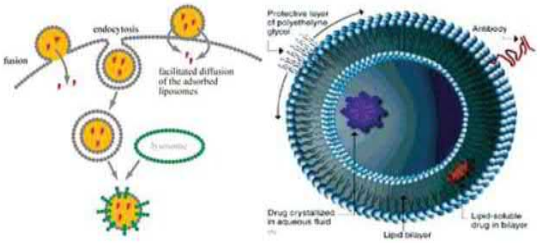


Рис. 6. **Схематичне зображення процесу злиття ліпосоми з клітиною**

Інший варіант взаємодії — клітинна мембрана і ліпосоми обмінюються ліпідами. І, нарешті, ліпосоми здатні злитися з мембранами клітин і стати їх частиною. При цьому можуть змінюватися властивості клітинних мембран, зокрема їхні в'язкість і проникність, поверхневий заряд. Може також збільшитись або зменшитись кількість каналів, що проходять через мембрани. Таким чином, завдяки ліпосомам з'являється новий спосіб спрямованого впливу на клітину, який можна назвати «мембранною інженерією».

Узагалі розподіл ліпосом в організмі залежить від складу ліпосомальної мембрани, розміру, заряду й інших хімічних чи фізичних параметрів везикул та іммобілізованих у них речовин, а також від способу їх уведення.

Так, наприклад, після підшкірного введення основна кількість ліпосом депонується у місці введення і вивільняється звідти переважно лімфогенним шляхом. Оптимальним способом доставлення ліпосомальних препаратів є місцеве введення їх у регіональні лімфовузли [14, 17].

За внутрішньом'язового введення ліпосоми здатні створювати депо препарату в місці введення. Швидкість вивільнення з депо залежить від розміру і властивостей ліпосом і становить від декількох годин (дрібні ліпосоми) до декількох днів (великі ліпосоми). Дрібні ліпосоми на відміну від великих, за внутрішньочеревного або внутрішньом'язового введення набагато швидше проникають у кровоносне русло, що вказує на обмежену здатність останніх проходити через капіляри і мембрани судин [14]. За внутрішньосудинного введення дрібні ліпосоми виводяться з кровотоку повільніше, ніж великі [18].

Як приклад можна навести результати роботи з дослідження процесу фагоцитозу за допомогою аналізу електронно-мікроскопічної картини взаємодії ліпосом із клітинами [19]. Було виявлено, що вже через 15 хв після введення ліпосоми адсорбуються на всій поверхні макрофагів. При цьому частина ліпосом за цей короткий період інкубації включається в цитоплазму макрофага. Через 30 хв усі ліпосоми з поверхні інтерналізуються в цитоплазму і зливаються з лізосомами, утворюючи фагосоми. Слід зазначити, що в цитоплазму включаються не тільки одиничні ліпосоми, а й скупчення (кластери) ліпосомальних везикул. Через 3 год інкубації ліпосоми втрачають свої зовнішні контури і на їх місці залишаються «тіні».

Таким чином, процес фагоцитозу ліпосом охоплює такі стадії:

– адсорбцію на зовнішній мембрані макрофага;
– поглинання ліпосомальних везикул;
– «перетравлення» біоматеріалу.

Враховуючи високу здатність поглинання ліпосом макрофагами, можна вважати, що фагоцитоз є одним з найважливіших механізмів взаємодії ліпосом із клітинами.

Сировина для одержання ліпосом

Значні обсяги виробництва ліпосомальних препаратів та жорсткі вимоги до жирнокислотного складу фосфоліпідів роблять актуальною проблему доступності джерел сировини. Основними методами виробництва фосфоліпідів є хімічний або ензиматичний синтез і виділення (екстракція) фосфоліпідів із природних джерел.

Існує декілька груп фосфоліпідів, які можна використовувати для приготування ліпосом, а саме: фосфоліпіди з природної сировини, модифіковані з природної сировини, напівсинтетичні, синтетичні, з натуральними «голівками».

Нижче перераховані фосфоліпіди, застосовувані у виготовленні ліпосом.

Природні:

- фосфатидилхолін (PC);
- фосфатидилетаноламін (PE);
- фосфатидилсерін (PS).

Синтетичні:

- діолеоїлфосфатидилхолін (DOPC);
- дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC);
- діолеоїлфосфатидилетаноламін (DOPE);
- дистеароїлфосфатидилетаноламін (DSPE).

На сучасному етапі найбільш оптимальним є використання у виробництві ліпосомальних препаратів природних фосфоліпідів (із бобів сої, льону, ріпаку, кукурудзи, соняшнику, ліщини, жовтків курячих яєць, молоків лососевих риб), оскільки введення ліпосом, створених на основі природної сировини лецитину або фосфатидилхоліну — ефіру фосфорної кислоти і жирних кислот не пов'язано з ризиком розвитку токсичних ефектів, імуногенності та алергічних реакцій. Окрім того, відсутні обмеження на застосування природного лецитину у виробництві харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів як у Європейському Союзі, так і в інструкціях Управління з контролю за якістю харчових продуктів, медикаментів і косметичних засобів FDA США [20].

Спочатку термін «лецитин» вживали щодо ліпідів, які одержували з яєчного жовтка. Згодом його почали використовувати як синонім конкретного фосфоліпіду — фосфатидилхоліну, який є головним компонентом фракції фосфатидів яєчного жовтка і бобів сої. У деяких медичних виданнях термін «лецитин» означає 1,2-діацил-гліцеро-3-фосфатидилхолін (L-α-лецитин). На противагу такому визначенню, у промисловості (зокрема, у технології виготовлення ліків та харчових добавок) і в торгівлі термін «лецитин» застосовують для визначення суміші нейтральних ліпідів (тригліцеридів, невеликої кількості «вільних» жирних кислот і стеролів), полярних ліпідів (фосфо- і гліколіпідів) та вуглеводів.

Лецитин знайдено в усіх живих організмах. Полярні ліпіди й інші фосфоліпіди виявляють у складі мембранних структур клітин тварин, рослин і мікроорганізмів. Однак для комерційного використання важливими є передусім джерела сировини з високою концентрацією фосфоліпідів. У тваринному світі це жовтки яєць, але вони досить дорогі. Рослинні джерела більш економічні, однак фосфоліпідний склад лецитину істотно змінюється залежно від клімату, ґрунту, умов росту, часу та терміну збору врожаю і виробничих умов. При цьому змінюються склад і властивості лецитину.

Комерційний (сирий) лецитин рослинного походження — досить складна суміш фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидіінозитолу та тригліцеридів. Крім того, до складу лецитину входять лізофосфатидилхолін, лізофосфатидилетаноламін і фосфатидилсерин. Для використання лецитину в різних галузях промисловості, зокрема в фармакології, слід виділити речовину чи групу речовин, які мають визначальні фармакологічні або фізико-хімічні властивості. Розроблення ефективних способів ідентифікації й розділення сумішей фосфоліпідів дає підставу на цей час стверджувати, що застосування препаратів лецитину у фармакології можна пов'язати з присутністю фосфатидилхоліну. Оскільки комерційні препарати лецитину — складні суміші, то стандартизація індивідуальних фосфоліпідів окрім їх ідентифікації та кількісного аналізу має також на меті аналіз показників якості.

Одержання фосфоліпідів із фосфатидних концентратів рослинного або тваринного походження здійснюється фракціонуванням органічними розчинниками. Традиційно найпопулярнішою сировиною для побудови ліпосом є яєчний або соєвий РС. Однак вміст РС у соєвих бобах — основному джерелі його виробництва з рослинної сировини — становить не більше 22–35,5% від загальної кількості фосфоліпідів, тимчасом як у жовтках курячих яєць — близько 72%. Це потребує для одержання рівних кількостей РС значно більше рослинної сировини, ніж курячих яєць.

Останнім часом увагу дослідників звернено на технологію лецитину і РС соняшнику [21–30]. Це зумовлено тим, що вміст фосфоліпідів у його насінні практично не відрізняється від бобів сої, проте кількість поліненасичених жирних кислот більша, і виділення фосфоліпідів відбувається за м'якої температурної обробки [31–34].

Порівняльні характеристики лецитину із соняшнику і сої [21, 24, 35–38] показали, що за основними показниками вони ідентичні, а за деякими (вміст тригліцеридів та вільних жирних кислот) лецитин із соняшнику перевершує соєвий (рис. 7).

Виробництво ліпосомальних систем

На цей час запропоновано багато різноманітних способів конструювання ліпідних везикул [39–49], що дають змогу одержувати ліпосоми різного розміру, складу, структури і внутрішнього об'єму. Властивості ліпосом, що утворюються із фосфоліпідів у водному середовищі, значною мірою залежать від способу їх одержання.

Багатошарові ліпосоми можуть утворюватися під час струшування водної дисперсії набряклого ліпіду. При цьому одержують суспензію ліпосом із широким розподілом за розмірами. Відносно гомогенну дисперсію ліпосом можна одержати, пропустивши їх

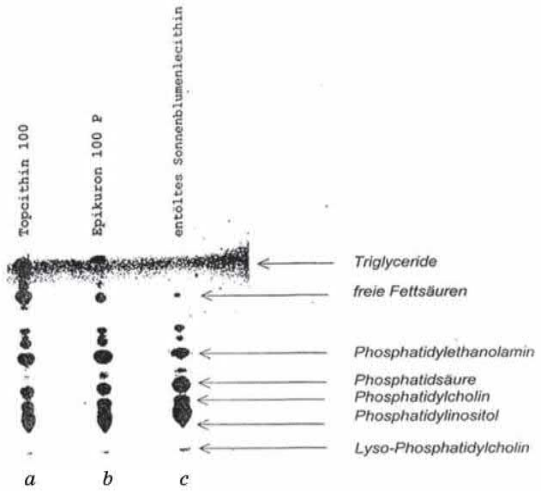


Рис. 7. **Порівняльний склад лецитину із соняшнику та сої^**
a, b — лецитин із сої; *c* — лецитин із соняшнику

через полікарбонатні фільтри із заданим розміром пор. Відстань між сусідніми ліпідними бішарами становить 2–3 нм, але може зростати до 20 нм і більше у разі заряджених бішарів. На 1 моль ліпіду багатошарові ліпосоми містять від 1 до 4 мл води. Вони мають властивості ідеального осмометра, змінюючи свій об'єм у відповідь на зміну концентрації водного середовища.

Крім того, багатошарові везикули можуть бути одержані за технологією, що включає процеси заморожування — танення і забезпечує багаторазове збільшення (з 5,8% до 88,6%) ефективності інкапсулювання порівняно з класичною технологією, яка ґрунтується на механічному перемішуванні ліпідної плівки з водою.

Малі мононламелярні ліпосоми одержують із багатошарових, обробляючи їх ультразвуком, впорскуючи спиртовий розчин ліпідів у водне середовище, пропусканням під великим тиском ліпідних дисперсій через невеликий отвір, а також методом видалення детергенту, що солюбілізує ліпід, діалізом або гель-фільтрацією. Такі ліпосоми містять 0,2–1,5 мл води на 1 моль ліпіду. Внаслідок малого розміру самої везикули ефективність інкапсулювання БАР у малі одношарові везикули знижується. Такі ліпосоми не мають осмотичної активності і не коагулюють протягом тривалого часу. Дрібні одношарові ліпосоми відрізняються високою агрегатною нестійкістю — вони або «закриваються», або піддаються коалесценції.

Великі мононламелярні ліпосоми мають значний внутрішній об'єм води (8–14 мл на 1 моль ліпіду) і осмотичну активність. Зазвичай їх виділяють видаленням солюбілізуючого детергенту в умовах контрольованого діалізу або впорскуванням розчину ліпіду в розчиннику (діетиловий ефір, петролейний ефір, пентан) у підігріту до 60 °С воду. Можлива і пряма екструзія під тиском до 5,5 МПа через фільтри з розміром пор близько 0,03 мкм. При цьому досягається ефективність інкапсулювання до 60%. Окрім того, великі одношарові ліпосоми можуть бути також виділені з малих ліпосом шляхом їх злиття під дією Ca^{2+} або в умовах термотропного фазового переходу.

Теоретично створення ліпосом можливе за допомогою диспергування відповідних ліпідів у воді. Однак на практиці мембранні ліпіди важко диспергуються у воді, тому для одержання дисперсії використовують органічні розчинники або досить енергоємні процедури [48, 49].

Істотно відрізняється від існуючих методів виробництва ліпосом спосіб, яким ліпід диспергують у водне середовище. Деякі методики створено спеціально для виробництва ліпосом зі специфічним застосуванням. Розмір ліпосом, розподіл їх за розмірами, ефективність захоплення БАР, утримувальна здатність — усе це слід брати до уваги, вибираючи відповідну методику. Методи одержання ліпосом можна класифікувати залежно від способу навантаження БАР. Існують методи пасивного і активного навантаження (схема).



Широке коло стандартних методів, розроблених для формування ліпосом, можна розділити на три основні групи:

– тонкоплівкові методи;

– засновані на застосуванні розчинників;

–із застосуванням високого тиску.

Згідно з більшістю із цих методів мембранні ліпіди так само, як і жиророзчинні інгредієнти, спочатку розчиняють в органічному розчинникові для досягнення гомогенної суміші, а потім суміш висушують для видалення максимальної кількості розчинника.

За тонкоплівковим методом розчинник видаляють випарюванням у роторному випарнику, одержуючи тонку плівку ліпіду на склі. Далі до ліпідної плівки додають воду та водорозчинні інгредієнти і струшують.

У методах, заснованих на застосуванні розчинників (етанол- або ефірінжекторний метод), суміш ліпіду і розчинника впорскують через голку безпосередньо у водну фазу з водорозчинними інгредієнтами. Потім розчинник видаляють діалізом або випарюванням (етанолінжекторна методика) або поступово випарюють під час повільного впорскування в гарячу водну фазу (ефірінжекторна методика).

Для виробництва багатошарових ліпосом без застосування розчинників використовують метод мікрофлюїдизації. Ліпідний препарат і водне середовище прокачують під високим тиском через мікроканали і розділяють на два струмені, які стикаються один з одним на високій швидкості.

Для створення ліпосом молекули ліпідів слід ввести у водне середовище. У роботі [50] наведено співвідношення способу гідратації ліпідів (первинного формування ліпосом) зі структурою ліпосом.

Відомі кілька способів гідратації ліпідів. Класифікацію їх подано в табл. 4.

Окрім цих методів, було ще розроблено додаткові, такі як процес «заморожування–танення», сублімаційного сушіння та екструзії. Проте всі вони ґрунтуються на гідратації ліпідів і попередньому одержанні «пустих» везикул.

Формування за плівковими методами

Властивості ліпідів змінюються залежно від їхнього складу. Однак один і той самий метод формування ліпосом можна використати для створення ліпідних везикул незалежно від їхнього складу. Загальними етапами є підготовка ліпідів для гідратації, гідратація шляхом змішування і калібрування з метою рівномірного розподілу везикул [51]. Розроблено багато різних варіантів

Таблиця 4. **Методи одержання ліпосом та кінцевих продуктів [50]**

Методи	Везикули
Механічні методи	
Струшування у вортексі або ручне	MLV
Екструзія через полікарбонатні мембрани за низького або середнього тиску	OLV, LUV
Екструзія за допомогою преса Френча, техніка «мікрофлюодайзера»	
Гомогенізація високим тиском	Здебільшого SUV
Оброблення ультразвуком	Здебільшого SUV SUV мінімального розміру
Кавітація	BSV
Методи, що ґрунтуються на заміні органічного розчинника водною фазою	
Видалення розчинника(ів)	
Використання не змішуваних з водою розчинників: ефіру і петролейного ефіру	MLV, OLV, SUV MLV, OLV, LUV
Впорскування етанолу	
Впорскування ефіру (випаровування розчинника)	LUV
Випаровування в оберненій фазі	LUV, OLV, MLV
Методи, засновані на видаленні детергенту	
Гель-хроматографія	SUV
«Повільний» діаліз	LUV, OLV, MLV
Швидке розбавлення	LUV, OLV
Інші методи	MLV, OLV, LUV, SUV

цього методу, що відрізняються тільки органічними розчинниками, які використовують для розчинення ліпідів, способами сушіння ліпідів і регідратації плівки.

Незважаючи на різні модифікації, спільним для всіх цих методів було одержання неоднорідних популяцій багатошарових ліпосом, розмір яких залежав від заряду ліпідів. Заряджені ліпіди утворювали менші за розмірами ліпосоми з меншою кількістю шарів.

Плівкові методи мають низку переваг. Їх можна застосовувати для різноманітних видів ліпідних сумішей. Вони прості у використанні, мають високий рівень інкапсуляції ліпідів і розчинних у воді речовин. Одним з основних недоліків є труднощі масштабування до промислових об'ємів.

Для створення ліпосом з відносно однорідними розмірами було створено кілька методів зменшення їхнього розміру. Вперше опублікованим методом зменшення розміру був ультразвуковий [52]. За цим методом значне споживання енергії внаслідок процесу кавітації мало місце до ліпосомальної дисперсії або безпосередньо в контакті з наконечником чи опосередковано у сонікаторі.

Інші методи, які руйнують великі багатошарові везикули, — гомогенізація, деформація або гомогенізація під високим тиском. До цієї групи включено також методи мікрофлюїдизації, гомогенізації під високим тиском, а також гомогенізації, спричиненої силою зсуву (струшування).

Найвідоміший метод для зменшення розміру — екструзія через фільтри (мембрани) із чітко визначеними отворами.

Методи гомогенізації

Ці методи застосовували у біології та мікробіології для руйнування клітин. Потім їх почали використовувати для зменшення розміру і кількості шарів багатошарових ліпосом.

Прес Френча [53] спочатку було створено для руйнування клітин за більш прийнятних умов порівняно з ультразвуковими методами, оскільки ліпіди, як і протеїни або інші чутливі сполуки, могли розкладатися під дією ультразвуку. Цю систему зазвичай використовують для об'ємів від 1 до 40 мл і тому вона не придатна для масштабного виробництва. Проте промислову стратегію масштабування, засновану на цій техніці, було реалізовано в процесі мікрофлюїдизації.

Починаючи з об'єму від 50 мл і більше для руйнування багатошарових ліпосомальних систем застосовують високий тиск. Обладнання працює в діапазоні тиску 2–200 бар із системою нагрівання та охолодження і за контролю температури зразка під час оброблення [54]. Ліпосомальна суспензія проходить через отвори різних розмірів кілька разів (до тисячі проходів). Під час цього процесу ліпосоми утворюються в діапазоні від 50 до 100 нм. Цей метод підходить для широкомасштабного промислового виробництва стерильних ліпосом.

На відміну від мікрофлюїдизації, де потік рідини розщеплюється і змішується у спеціальній камері, гомогенізатори працюють за іншим принципом. У гомогенізаторі струмінь рідини під дією високого тиску проходить через отвір і стикається зі стінкою камери. Ліпосомальна суспензія безперервно прокачується через систему гомогенізатора, де генерується високий тиск для зменшення розміру ліпідних везикул [55].

Відомим методом зменшення розміру ліпосом із можливістю масштабування є екструзія. За цим методом везикули пропускають через мембрани за нижчого тиску, ніж у методі прес Френча. Методику екструзії через полікарбонатні мембрани вперше було опубліковано в роботі [56]. Дослідження впливу складу ліпідів і розміру мембрани на створення ліпосом у процесі екструзії було здійснено в роботі [57]. Для всіх методів зменшення розміру ліпосоми мають бути екструдовані за температури вище T_c фазового переходу.

Альтернативою є розроблений безперервний екструзійний пристрій [58], що працює із системою насосів і складається з термостабільних скляних ємностей, безпосередньо пов'язаних із пневматичним поршневим насосом високого тиску. Останній працює за тиску нижче 0,5 МПа (5 бар). Газ не вступає в контакт з ліпосомальною суспензією, і робочий тиск під час екструзії може за допомогою редукційного клапана досягати 12 МПа (120 бар).

Спільним для всіх розглянутих методів екструзії є те, що відтворюваність розміру везикул є надзвичайно високою, а системи з нагрівальним елементом можна використовувати як для насичених, так і для ненасичених жирних кислот. Основним недоліком є тривалий період підготовки, починаючи з одержання «пустих» ліпосом, далі заморожування — танення і, нарешті, екструзія. Загалом, можливі високі втрати продукту, особливо якщо відбувається засмічення екструзійних мембран, що призводить до технічних обмежень під час широкомасштабного виробництва.

Методи, засновані на заміні органічних розчинників водним середовищем

Ці методи формування ліпосом об'єднує те, що органічні розчинники, які змішуються або не змішуються з водою, заміщуються водним розчином. Така заміна здійснюється або шляхом введення ліпідів, що містять органічний розчин, у водну фазу — методи впорскування, або ступінчастим додаванням водної фази в органічну фазу. Методи емульгування, зокрема метод випаровування в оберненій фазі та метод подвійної емульсії, ґрунтуються на заміщенні розчинника, що не змішується з водою, водною фазою, унаслідок чого утворюються ліпосоми з високим рівнем інкапсуляції гідрофільних речовин, а також речовин, розчинних у ліпідній фазі.

Метод впорскування етанолу

Цей метод уперше було описано в роботі [59] як альтернативу формуванню SUV без використання ультразвуку. За цим методом молекули ліпідів утворюють спочатку двошарові пласкі фрагменти, які потім формують ліпосомальні системи, інкапсулюючи водну фазу [60].

Параметри процесу формування, які впливають на розмір ліпосом, розподіл за розмірами та ефективність інкапсуляції, більш детально досліджено в роботі [61]. Показано, що концентрація ліпідів у етанолі — це один із параметрів, що впливають на формування ліпосом. Швидкість перемішування водної фази і впорскування не мала значного впливу на розмір ліпосом та розподіл їх за розмірами.

Інший, модифікований, метод впорскування етанолу [62] тією чи іншою мірою є поєднанням методів впорскування етанолу, проліпосом і технології випаровування в зворотній фазі. Він має певні переваги, оскільки технологія, у принципі, є нескладною для масштабування, а етанол — відносно нешкідливий розчинник, дозволений для впорскування у концентрації максимум 0,1% [63]. Можна використовувати й деякі інші розчинники, однак слід мати на увазі норми стосовно залишків розчинників, що їх поділяють на різні категорії за Європейською чи Американською фармакопеями.

У роботі [64] подано результати розвитку технології виробництва ліпосом у промислових масштабах, що ґрунтується на техніці впорскування етанолу. Таку технологію було використано для ліпосомальних інкапсуляцій еконазолу, похідного імідазолу, для місцевого лікування дерматомікозів. Вона поєднувала принципи системи впорскуваня етанолу і гомогенізації за високої швидкості зсуву.

Беручи за основу метод впорскування етанолу, автори [65] розробили технологію зі стерильними умовами виробництва, придатну для будь-яких масштабів — від звичайного процесу одержання однієї партії до безперервного виробництва. При цьому основним елементом був спеціально розроблений модуль [66]. До переваг цієї технології належить можливість змінювання характеристик струменів впорскування, що дає змогу здійснювати виробництво ліпосом незалежно від масштабів виробництва, оскільки масштабування визначається тільки розмірами ємностей. Визначивши параметри процесу в лабораторних умовах, можна легко змінити масштабування виробництва зміною виробничих ємностей, які можна стерилізувати парою або в автоклаві. Усю сировину (буферні розчини, розчин ліпідів у етанолі і навіть азот для тиску впорскування) передають до системи санітарної обробки та стерилізації через 0,2 мкм фільтри, що є гарантією асептичного виробництва [67].

Розмір ліпосом можна контролювати за допомогою локальної концентрації ліпідів у місці впорскування, яка визначається за концентрацією ліпідів у етанолі, діаметром сопла, тиском упорскування і швидкістю потоку водної фази. Змінюючи ці параметри, можна виділити ліпосоми різних розмірів. Ці параметри також є визначальними для відповідного рівня відтворення стосовно діаметрів везикул і швидкості інкапсуляції [68]. Наступним кроком процесу було видалення етанолу, а також залишків БАР за допомогою тангенціальної фільтрації потоку.

Ще однією важливою перевагою цього методу є придатність до інкапсуляції БАР [71], якої було досягнено пасивною інкапсуляцією таких речовин, як великі гідрофільні протеїни, та за допомогою методу одноступеневого завантаження малих амфіфільних лікарських препаратів або методу асоціації антигенів для вакцин [69].

Метод проліпосом–ліпосом

Основою цього методу є перетворення вихідної проліпосомальної форми на ліпосомальну дисперсію шляхом розведення у водній фазі [62]. Його використовують для інкапсуляції широкого спектра речовин з різним ступенем розчинності у воді або спирті і з надзвичайно високою ефективністю інкапсуляції порівнянно з іншими методами, що грунтуються на пасивному захопленні.

На основі цього методу [70, 71] розроблено процес стерильного виробництва ліпосом. Процес одержання ліпосом корегували зміною швидкості розведення і температури. Метод легко піддається масштабуванню, що робить його альтернативою виробництву ліпосом для клінічного застосування.

Випаровування в реверсній (оберненій) фазі (REV)

Аналогічно методам впорскування гідратація ліпідів може відбуватися шляхом розчинення в органічному розчинникові з подальшим уведенням у водну фазу. Органічна фаза не змішується з водною і таким чином створюється емульсія олії у воді, яку в подальшому розбавляють водною фазою для створення ліпосом [72]. Перевагою цієї технології одержання ліпосом є високий рівень інкапсуляції БАР — до 50%. В одному з варіантів методу мікроемульсії — подвійної емульсії — було збільшено швидкість інкапсуляції для одержання одношарових ліпосом [73]. Одним з можливих недоліків цього методу є залишкові концентрації розчинника. Інший момент стосується можливості здійснення масштабування виробництва, відповідних перемішувальних пристроїв для створення мікроемульсії та насосів для розведення.

Методи, засновані на видаленні детергентів

За цими методами для солюбілізації ліпідів у міцелярних системах використовують детергенти. На відміну від ліпідів, детергенти добре розчиняються як у воді, так і в розчинниках. Існує рівновага між молекулами детергенту у водній фазі й ліпідами у середовищі міцели. Розмір і форма одержаних везикул залежать від хімічної природи детергентів, їхньої концентрації та характеристик ліпідів. На сьогодні найпоширеніший метод реконструкції мембранних протеїнів включає солюбілізацію протеїнів мембрани і фосфоліпідів [74–76]. Загальні способи видалення детергенту зі змішаних міцел — розведення [77], гель-хроматографія [78] та діаліз через порожнисті волокна [79] або мембранні фільтри [80]. Окрім того, детергенти можна видаляти адсорбцією гідрофобними смолами або циклодекстринами [81]. Діаліз змішаних міцел у водному середовищі вперше описано в роботі [82]. Цей метод формування везикул передбачає збереження міцели, тимчасом як вільні молекули детергенту видаляють. Аби краще контролювати формування протеоліпосом, було розроблено нову методику, що поєднує передову технологію впорскування етанолу, а також метод перехресних струменів упорскування (впорскування у перехресному потоці) [65] з розчиненням детергенту за одноступеневим методом. Таким чином, ліпідні везикули утворюються відразу після впорскування в міцелярні розчини протеїнів. Складну технологію впорскування [66], яку раніше використовували для пасивної інкапсуляції розчинних у воді протеїнів, можна адаптувати для одноступеневого процесу розведення детергенту/формування везикул [69].

Найвідомішою технологією одержання полімерних ліпосом є метод з використанням синтетичних ліпідів на основі діацетилен-, дієн- і метакрилоїл-похідних фосфатидилхоліну та диметилдіалкіламіну. За рахунок диспергування у водному середовищі й нагрівання вище температури фазового переходу такі ліпіди утворюють замкнені бульбашки, що складаються із серії концентричних сфер, розділених водною фазою.

Полімеризація може здійснюватись як у гідрофобній, так і в гідрофільній ділянці бішару. Вона ініціюється або УФ-опроміненням (довжина хвилі 254 нм), або радикальною полімеризацією — за допомогою азабісізобутиронітрилу. Залежно від типу ліпіду, умов полімеризації, тривалості опромінення і його інтенсивності методом приготування водної дисперсії виділяють ліпосоми діаметром від декількох десятків до декількох сотень нанометрів. Порівнянно зі звичайними ліпосомами полімерні є більш стабільними. Крім того, полімерні ліпосоми, що містять у своїй структурі поліакрилові кислоти, мають противірусні властивості.

У роботі [83] аналізують ліпосоми, одержані методами етанольної інжекції, випарювання з оберненої фази, ручного струшування і оброблення ультразвуком. У результаті досліджень автори встановили, що найбільш ефективним є метод «випарювання з оберненої фази», який дає змогу виділяти ліпосоми з рівнем включення 80%.

Ліпосоми, одержані різними методами, відрізняються за розміром і структурою. Найбільші везикули можна вилучити за допомогою методу ручного струшування. Ліпосоми, одержані методом етанольної інжекції та випарювання з оберненої фази, містять гетерогенні за величиною везикули, проте в середньому вони приблизно удвічі дрібніші. Оброблені ультразвуком ліпосоми були найбільш однорідними і досить дрібними за розмірами (середній діаметр ~ 12 нм).

Збільшення кількості ліпідів у препараті та зменшення кількості активної речовини дає змогу значно підвищити включення активних речовин. Наприклад, за постійної кількості ліпідів у препараті й зміни кількості використовуваного інсуліну (20, 100, 500, 2000 Од/г) ступінь включення гормону в ліпосоми становить 96, 91, 84 і 40%, відповідно. Для більшості вивчених БАР оптимальне співвідношення активний компонент : ліпід у ліпосомі становить 1:10 [84].

Автори роботи [85], вивчаючи метод одержання ліпосомальних препаратів, призначених для лікування туберкульозу, експериментально порівняли чотири методи (ультразвукове диспергування, детергентний діаліз, багаторазове заморожування–танення і механічне диспергування) і показали, що оптимальним є механічне диспергування. У результаті застосування цього методу було виділено мультиламелярні ліпосоми, що містили яєчний фосфатидилхолін, холестерол і стеаринову кислоту в співвідношенні 10:0,5:0,2. Для підвищення стабільності під час зберігання до їхнього складу було введено α-токоферол (6 мг/мл). Сумарна концентрація ліпідів у ліпосомах становила 200 мг/мл [86].

У роботі [87] для одержання ефективного ліпосомального індуктора інтерферону використовували модифікований метод екструзії багатошарових (мультиламелярних) везикул через ядерні мембрани, одержані на основі поліетилентерефталатної плівки. Метод уможливив виділення ліпосом із включенням активного компонента до 55–65%. Для підвищення стабільності ліпосомального препарату застосовували заморожування за температури від –30 °С до –50 °С, після чого ліофільно висушували упродовж 36–48 год. Відразу після сушіння флакони герметично закупорювали в атмосфері інертного газу в асептичних умовах. Ліпосоми зберігали стабільність упродовж тривалого часу (рік) при температурі 4 °С. Оцінювання стабільності ліпосомальної форми було проведено методом аналізу накопичення у препараті пероксидів ліпідів за збереження інтерфероніндукувальної активності [88]. Встановлено, що під час зберігання протягом 1 року зниження інтерфероніндукувальної активності та накопичення у препараті пероксидів ліпідів не відбувається.

У роботі [89] запропоновано спосіб одержання композиції у три стадії. На першій утворюються пусті ліпосоми, на другій — відбувається змішування отриманих ліпосом із розчином кріопротектора і активним компонентом, на третій — проводять висушування. Такий метод забезпечував одержання дрібних ліпосом (розміром від 100 до 200 нм) з високою інкапсулювальною активністю, що особливо корисно у процесі виробництва фармацевтичних препаратів. Метод давав змогу скоротити час процесу і виділити стабільні ліпосоми.

Висушування суміші, яка містить ліпосоми, можна проводити з використанням традиційних методів, зокрема ліофільного або розпилювального сушіння, флеш-кристалізації, сушіння в повітряному потоці (наприклад, у псевдозрідженому шарі), вакуумного та пічного сушіння тощо. Механічні властивості продуктів, висушених різними способами, відрізнятимуться: продукт розпилювального сушіння — порошок, ліофільним висушуванням отримують твердий «коржик», однак властивості ліпосом за регідратації, з погляду їх стабільності, будуть загалом схожі. Механічні властивості ліпосом, одержаних за допомогою розпилювального сушіння, кращі, ніж за ліофільного сушіння.

Спосіб виробництва ліпосом, стабільних під час зберігання, запропоновано в оботі [90]. Везикула містить оболонку з лецитину і негативно зарядженого компонента, яким слугує суміш кислих фосфоліпідів, що виділяються із соєвих фосфатидів. Склад оболонки такої ліпосоми, апробований у лабораторних умовах, дозволяє виділяти суспензії апірогенних і атоксичних ліпосом, стійких під час зберігання протягом 1 року і зі стабільними фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Спосіб одержання ліпосом та їх суспензій включає розчинення нейтральних заряджених фосфоліпідів, що містять залишки насичених жирних кислот; видалення розчинника; одержання залишку; змішування залишку з водним розчином, який може містити БАР; струшування або перемішування отриманої суміші [91]. Масове співвідношення нейтрального і зарядженого фосфоліпідів — від 200:1 до 3:1. Ліпосоми, отримані за цим методом, мають середній розмір від 50 до 3000 нм, інкапсулювальна здатність становить 6–10 мл/г, загальна концентрація ліпідів — від 20 мг/мл до 100 мг/мл. Нейтральний ліпід — фосфатидилхолін, заряджені фосфоліпіди — фосфатидилсерин, фосфатидилгліцерол, фосфатидилінозит, фосфатидна кислота або ефір фосфатидної кислоти й аміноспирту.

Запатентовано спосіб [92] одержання одношарових та багатошарових ліпосом діаметром більше 0,1 мкм, що містять нерозчинений або розчинний у воді субстрат, який складається з біологічно, хімічно або фізично активних частинок, і передбачає три стадії: утворення ліпосом; сушіння заморожуванням (ліофілізацію); їх регідратацію в подрібненій суміші з матеріалом, який в них міститься. Сировиною для одержання ліпосом є фосфатидилхолін і/або дистеароїлфосфатидилхолін. Ліпідна композиція додатково містить один або декілька таких компонентів, як холестерол, фосфатидилгліцерол і триолеїн. Стадію ліофілізації проводять з БАР, яка має бути інкапсульована.

Фактично весь органічний розчинник (хлороформ), що його використовують для отримання ліпосом у першій стадії, видаляють перед стадією регідратації або ліофілізації. Як активний матеріал застосовують мікроорганізми, клітини рослин чи тварин або нерозчинні у воді структури, що мають незначну біохімічну або імунологічну активність в органічному розчинникові. Після стадії регідратації мікроорганізми або клітини одержують поживні речовини через мембрану ліпосоми, що сприяє їх культивуванню і розмноженню. Описаний спосіб дає змогу виділяти на першій стадії одношарові ліпосоми діаметром 0,1–50,0 мкм і багатошарові — 1,0–30,0 мкм. Третю стадію проводять регульованим додаванням води в малій кількості, достатній для утворення суспензії, з наступним додаванням через 20–40 хв такої самої кількості відповідного буфера, біологічно сумісного з матеріалом, що інкапсулюється. Суспензію витримують 20–40 хв і змішують з великим об'ємом буфера (сольовий розчин з фосфатним буфером), pH — 7,4.

У роботі [93] для одержання ліпосомних аерозолів з малим розміром частинок для доставлення антиканцерогенних лікарських препаратів застосовують спосіб, що передбачає стадії розчинення: ліпідрозчинного протиракового лікарського препарату, відповідного ліпіду для композиції і доставлення препарату за допомогою аерозолю; об'єднання розчинених препарату і ліпіду з одержанням розчину, в якому концентрація препарату не перевищує близько 10% від загального об'єму; випарювання розчинників із розчину.

Згодом було розроблено форму полімеризованих ліпосом, у яких фосфоліпіди, що утворюють ліпосому, з'єднані один з одним ковалентними зв'язками і не злипаються під дією фізичних сил. Це сприяло більшій стабільності порівнянно зі звичайними ліпосомами, запобігало їх агрегації та злипанню як у процесі одержання, так і під час зберігання.

Проліпосомний підхід у виробництві ліпосом

Під проліпосомами розуміють речовини, які у процесі взаємодії з водою спонтанно утворюють ліпосоми. Цей метод дає змогу вирішити дві основні проблеми: одержання стерильних проліпосомальних форм та інкапсулювання активних компонентів безпосередньо перед уведенням в організм [94].

Проліпосоми самі по собі складаються з ретельно відібраної суміші фосфоліпідів у гідрофільному середовищі — суміші гідрофільних розчинників, зазвичай, але не обов'язково, водного етанолу та гліцеролу [95]. У проліпосомах ліпіди структуровані у формі складених бішарів. Система не містить достатньої кількості води для формування ліпосом. Утворення ліпосом починається з простого додавання надлишку води. При цьому для клініки потрібен стабільний препарат, що зберігається тривалий час. Отже, ліпосоми потрібно висушити так, щоб перед уживанням залишалося тільки додати води, при цьому має утворитись така сама суспензія ліпосом, як і вихідна (до сушіння). Крім того, більша частина БАР має бути всередині ліпосом, інакше вся процедура втрачає сенс.

Можна використовувати два основних типи проліпосом. Один — із ненасиченими фосфоліпідами, які перебувають у рідкокристалічній фазі вже за кімнатної температури, інший –з гідрогенізованими фосфоліпідами у стані гелю.

Оскільки ліпосоми можуть бути утворені тільки в рідкокристалічній фазі, формування їх із використанням гідрогенізованих фосфоліпідів слід виконувати за підвищеної температури.

Існує кілька способів одержання проліпосом [96–98]. Один із них — регідратація ліофільно висушених у вигляді тонкої плівки фосфоліпідів. Для цього вихідні ліпіди розчиняють в органічному розчинникові (хлороформ або етанол), потім розчин висушують до утворення тонкої плівки ліпідів. Після додавання до отриманої плівки води або водного буферного розчину утворюються багатошарові ліпосоми [99].

Запропоновано спосіб одержання проліпосом змішуванням фосфоліпідів, органічного розчинника і наповнювача. Активними

компонентами у проліпосомах слугують протеїни або ензими. Характерною особливістю цього методу є те, що біологічно активний компонент вводять у проліпосоми шляхом змішування сухих проліпосом з розчином БАР у полярному розчинникові, а сушіння їх проводять у два етапи — до і після введення БАР. Концентрація БАР у водних розчинах становить від 0,01 до 5,0 мг/мл [100].

Відомий також спосіб одержання проліпосом на основі так званих речовин-носіїв [99, 101]. Як носії використовують речовини, що мають розвинену зовнішню і внутрішню поверхню (високопористі), не розчинні в органічних розчинниках і добре розчинні у воді, наприклад цукри і полісахариди (глюкоза, фруктоза, декстрини тощо), поліоли (сорбіт, ксиліт та ін.), солі та порошкоподібні речовини. У роботі [101] запропоновано застосовувати не розчинні у воді й органічному розчинникові речовини (наприклад, оксид кремнію) або полімери, що набухають у воді, які потім видаляють із ліпосомальної дисперсії діалізом чи центрифугуванням.

Існує ще один спосіб утворення ліпосом. Ліпосомальні дисперсії утворюються з негативно заряджених ліпідів, які набухають у воді (фосфатидилсерин, фосфатидна кислота, фосфатидилгліцерол). Ліпіди, які не несуть заряду або є в цілому електрично нейтральними (фосфатидилхолін), не набухають зовсім або набухають лише до граничної товщини водного прошарку між ламелами. Заряджені ліпіди схильні до необмеженого набухання і можуть включати воду між ламелами аж до порогової точки, коли утворюються фази повністю гідратованих мононламелярних везикул, що перебувають у стані рівноваги з водою. Ступінь набухання і відносна стабільність моно- і мультиламелярних структур визначаються електростатичними взаємодіями. За низької іонної сили відбувається дестабілізація мультиламелярних структур. Необмежене набряканння може відбуватись і в тому разі, коли в суміші ліпідів міститься всього кілька відсотків заряджених ліпідів.

Основні типи проліпосом наведено в табл. 5.

Таким чином, сучасні проліпосомні технології дають змогу: уникнути енергоємних стадій, небажаних розчинників, застосовувати нескладне обладнання, зробити відносно нескладним інкапсулювання корисних речовин, проводити масштабування у промисловому виробництві.

Таблиця 5. **Типи проліпосом [100]**

Показники	Проліпосоми С	Проліпосоми S	Проліпосоми Н	Проліпосоми DUO
Склад				
Масова частка фосфатидів	Ненасичені соєві фосфоліпіди 40 %	Ненасичений фосфатидилхолін +заряджені ліпіди 30%	Гідратований фосфатидилхолін 20%	Ненасичені соєві фосфатиди 50%
Масова частка гідрофільного середовища	Гліцерол / водний етанол 60 %	Водний етанол 70 %	Водний етанол 80 %	Гліцерол/водний етанол 50%
Фізико-хімічні показники				
Водневий показник (pH) 1%-го розчину	5–6	5–7	5–7	5–6
Характеристика отриманих ліпосом				
Розчинник		Демінералізована вода	Демінералізована вода	
Діаметр, нм		225–250	300	
Внутрішній об'єм, мл/г		10	10	
Структура		Олігошарова або багатошарова		
Ефективність використання внутрішнього об'єму		100% — у разі ліпофільних компонентів; до 50% — гідрофільних компонентів	100% — у разі ліпофільних компонентів; до 60% — гідрофільних компонентів	

Незалежно від того, який проліпосомний спосіб обрано, приготування ліпосом має відбуватися за вищої температури, ніж під час переходу ліпіду з гелю в рідкокристалічну фазу. Ця температура переходу, як правило, нижча 0 °С, але в разі повністю гідрогенізованих (насичених) ліпідів може бути значно вищою за кімнатну. Якщо використовують такі ліпіди, то процедура приготування проліпосом залишається такою самою, але всі операції слід виконувати за підвищених температур.

У роботі [94] показано, що захоплення водорозчинних компонентів є найефективнішим за двостадійного процесу розведення. Схему процесу подано в табл. 6.

У разі використання цих методів ефективність захоплення для більшості гідрофільних речовин зазвичай лежить у межах 40~60%, але може досягати 70~80%. Для ліпофільних речовин ефективність захоплення змінюється залежно від їхніх індивідуальних властивостей і може наближатися до 100%. Однак кількість жиророзчинних компонентів загалом не перевищує 25% від вмісту фосфоліпіду.

Основна перевага системи проліпосом — можливість завантаження гідрофільних і ліпофільних активних компонентів [102, 103].

Аналізування ліпосом

Для характеристики ліпосом і ліпосомальних препаратів існують численні методи дослідження. Недоліком, загальним для всіх методів вимірювання, є необхідність застосування складного обладнання, що навіть на сьогодні унеможливлює швидке одержання достовірних параметрів якості. Основні характеристики ліпосом та методи їх контролю наведено в табл. 7.

Головні чинники, які характеризують ефективність ліпосомальних препаратів: фізична присутність ліпосом, їхній розмір і кількість шарів, об'єм внутрішньої ділянки.

Методами оцінки якості ліпосом є, зокрема, світлорозсіювання, фотонна кореляційна спектроскопія, негативне контрастування, кріосколювання (заморожування–танення) та ін.

Розміри ліпосом можна визначати за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії, розмір і морфологію частинок — електронною мікроскопією.

Передусім слід упевнитися в тому, що ліпосоми у складі відповідного засобу присутні. Найпростіший метод визначення присутності ліпосом — використання будь-якої форми мікроскопії. Ліпосоми малі й розсіюють мало світла. Вони зазвичай виявляються як дуже маленькі «крапкоподібні» сфери, які важко відрізнити від масляних крапельок або крихітних пухирців повітря. Якісних зображень можна досягти, застосовуючи високоякісну кріомікроскопію.

Найпоширенішим є визначення присутності ліпосом за допомогою електронної мікроскопії (ЕМ), яка має додаткову перевагу в тому, що надає інформацію про структуру ліпосом. Розрізняють чотири основних типи ЕМ.

1. ЕМ тонкого зрізу: придатна для спостереження клітинних мембран, але не ефективна для ліпосом, оскільки включає стадію первісної екстракції розчинником.

Таблиця 6. **Схема інкапсулювання в ліпосоми водо- і жиророзчинних компонентів проліпосомним методом**

Стадія	Операції
1-ша стадія: перетворення проліпосом на ліпосоми	Змішування ліпофільних (активних) компонентів з проліпосомами *Умови*: – повільне перемішування 30–50 об/хв; – час 15 хв; – температура для ненасичених ліпідів+25 °С; для насичених +65 °С
	Введення розчину гідрофільних (активних) компонентів. *Умови:* – швидке перемішування 1 000–10 000 об / хв; – час 15 хв; – температура для ненасичених ліпідів+25 °С, для насичених +65 °С; – об'єм води достатній тільки для початку формування ліпосом. Виходить висококонцентрована суспензія завантажених ліпосом
2-га стадія: розведення суспензії ліпосом	Додавання водного середовища, що не має активного компонента *Умови:* – повільне перемішування 30–50 об / хв; – час 10 хв; – температура +25 °С

Таблиця 7. **Характеристики ліпосом та інструментальні методи контролю якості**

А. Біологічні характеристики	**Методи аналізу**
Стерильність	Аеробні/анаеробні культури
Пірогенність	Дослід на тваринах
Токсичність у дослідах на тваринах	Моніторинг виживання щурів
В. Хімічні характеристики	
Концентрація фосфоліпідів	HPLC/метод Барлета
Концентрація холестеролу	HPLC/метод окиснення холестеролу
Концентрація БАД	Відповідний метод аналізу
Окиснення фосфоліпідів	UV-спектроскопія
Гідроліз фосфоліпідів	HPLC/TLC
Автоокиснення холестеролу	HPLC/TLC
Зміна антиоксидантних властивостей	HPLC/TLC
pH	pH-метр
С. Фізичні характеристики	
Форма везикул та морфологія поверхні	TEM та SEM
Розміри великул і розподіл за розмірами	Динамічне розсіювання світла, TEM
Заряд поверхні	Електрофорез
Потенціал та pH поверхні	Вимірювання зета- потенціалу та pH-чутливі електроди
Кількість шарів	
Поведінка фаз	DSC, заморожені зразки для електронної мікроскопії
Відсоток інкапсульованої речовини	Мініцентрифужні стакани, гель-хроматографія
Вивільнення активної речовини	Дифузія клітин/ діаліз

2. ЕМ пофарбованого негативу: більш придатна. Основна проблема полягає в тому, що використовують барвники з важких металів (молібдат амонію, цитрат свинцю), які призводять до агрегації і можливої реорганізації ліпосом. Цей спосіб може дати реальне зображення індивідуальних ліпосом, але його слід використовувати з обережністю у багатокомпонентних системах.

3. Сканувальна ЕМ: застосовується вкрай рідко.

4. ЕМ замороженого відколу: вважається кращим методом із чотирьох можливих типів ЕМ. Зразок, що містить воду, швидко заморожують у рідкому азоті, потім розколюють на два шматки. Поверхня зламу (замороженого відколу) містить топографічні особливості, які досліджують у трансмісійному електронному мікроскопі. Техніка процесу може бути розділена на три стадії: заморожування, розколювання, приготування зразка. Швидке заморожування є необхідним для збереження ультраструктури без руйнування її кристалами льоду.

Метод ЕМ замороженого відколу може бути використаний для загальної оцінки стабільності (якість мембран, злиття — у тому числі під час зберігання).

Визначення розміру ліпосом

Існують два основних підходи до визначення розміру ліпосом. Найкращим є метод вибору, тобто використання визначників розміру частинок (particle sizers) із застосуванням лазерно-кореляційної спектроскопії (PCS) та атомно-силової мікроскопії (AFM).

PCS включає аналіз тимчасової залежності інтенсивності коливань у розсіяному лазерному світлі, зумовлених броунівським рухом частинок у розчині (суспензії). Оскільки маленькі частинки в розчині дифундують з більшою швидкістю порівняно з великими, швидкість коливань розсіяного світла змінюється відповідно. Математичний аналіз інтенсивності коливань (кореляція) дає змогу визначити коефіцієнт дифузії частинок (D). Підставляючи величину, одержану для коефіцієнта дифузії, у рівняння Стокса–Ейнштейна, можна обчислити еквівалентний гідродинамічний радіус частинок (R_h):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h},$$

де k — константа Больцмана;
T — абсолютна температура;
η — в'язкість розчинника.

Об'єм захоплення ліпосомального препарату — це об'єм внутрішнього водного простору. Його найзручніше виражати в мл/г ліпіду, і це дуже важливий параметр, коли йдеться про капсулювання ліпосом.

Загальний об'єм (V) і площа поверхні (S) сферичної ліпосоми з діаметром **r** становлять:

$$V = \frac{4\pi \cdot r^3}{3} \quad \text{і} \quad S = 4\pi \cdot r^2 \text{, відповідно.}$$

Об'єм типової SUV (діаметр 25 нм) і типової LUV (діаметр 250 нм) відрізняються в 1000 разів. Ця різниця збільшується до 3 400 для об'єму захоплення після прийняття в розрахунок товщини ліпідного бішару (3–5 нм). Така велика різниця в об'ємі компенсується тим, що з фіксованої кількості ліпіду може утворитися набагато більше SUV, ніж LUV. Величини діаметра, кількості шарів і об'єм захоплення, безсумнівно, тісно пов'язані [94].

На практиці ситуація є дещо складнішою, оскільки ліпосомальні препарати ніколи не бувають повністю однорідними.

Об'єм захоплення можна визначити за допомогою низки методів, але найкращий серед них для водорозчинних молекул — метод інуліннедоступного простору (Inulin Inaccessible Space — IIS) [104].

Інулін — це багатомолекулярний полісахарид, який не може проходити через ліпідний бішар. Принцип, що лежить в основі виміру, досить простий. Якщо фіксовану масу інуліну (або в разі використання Н-міченого інуліну фіксоване число імпульсів) додати до однакових об'ємів ліпосомної суспензії та розчину без ліпосом, то концентрація інуліну в зовнішній водній фазі ліпосомної суспензії буде вищою, ніж у зразку без ліпосом. Концентрацію інуліну в зовнішній водній фазі ліпосом можна визначити подальшим центрифугуванням і відбором зразка на поверхні супернатанта.

Якщо кількість імпульсів N, спрямованих до зразка об'ємом V, і кількість радіоактивних імпульсів на 1 мл в супернатанті й у зразку загалом дорівнює N_{spn} і N_{con} відповідно, то

$$N_{spn} = \frac{N}{\left(V - V_{lips}\right)} \quad \text{і} \quad N_{con} = \frac{N}{V},$$

де V_{lips} — об'єм, що його займають ліпосоми і, отже, недоступний для інуліну.

Якщо зразок містить W грамів ліпіду, то простір, недоступний для інуліну на 1 г ліпіду (IIS), розраховують так:

$$IIS = \frac{V\left(1 - \frac{N_{con}}{N_{spn}}\right)}{W}, \quad V\left(1 - \frac{N_{con}}{N_{spn}}\right) = V_{lips}.$$

На практиці, як правило, більше значення має об'єм внутрішнього водного простору ліпосом, ніж об'єм, що його займають ліпосоми. Якщо щільність ліпіду прийняти рівною 1 г / мл, то внутрішній об'єм ліпосом на 1 г ліпіду V_{int} виражають як

$$V_{int} = \text{IIS} - 1.$$

Захоплювальна здатність SUV ліпосом, одержаних за проліпосомним методом, набагато вища, ніж у SUV, виділених за іншими методами (10 і 2 мл / г відповідно). Вона також вища, ніж у MLV, і порівнянна тільки з LUV (табл. 1), які вважають найефективнішими ліпосомами з погляду захоплюваного об'єму. Однак ліпосоми, одержані проліпосомним методом, як правило, мають більше одного шару, що підвищує їхню механічну міцність, а здатність до утримання водорозчинних речовин вища, ніж у LUV.

Ліпосоми, наносоми, ліпосомальні форми препаратів, способи виробництва ліпосом, шляхи підвищення стабільності ліпосомних везикул і сфери застосування ліпосомальної форми препаратів та сучасні рецептури на їх основі є на сьогодні одним з наукових напрямів, який активно розвивається в усьому світі, що, безумовно, пов'язано з унікальними властивостями цих об'єктів.

Ліпідні наноконтейнери є одними з перспективних об'єктів для вирішення завдань, пов'язаних із цілеспрямованим доставленням БАР у необхідних концентраціях у препаратах та пролонгуванням їх фармакологічної дії.

Проте слід пам'ятати, що фосфоліпіди і, передусім, ліпосоми не є компонентами для повсякденних шаблонних рецептур, і щоразу перед розробниками постає складне завдання — підібрати або знайти нові необхідні композиції та методи приготування ліпосомальних везикул.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Bangham A. D.* Negative Staining of Phospholipids and their Structured Modification by Surface Agents as Observed in the Electron Microscope // J. Mol. Biol. — 1964. — V. 8. — P. 660–668.
2. *Bangham A. D.* Diffusion of Univalent Ions Across the Lamelae of Swollen Phospholipids // Ibid. — 1965. — V. 13. — P. 238–252.
3. *Gregoriadis G., Leathwood P. D., Ryman B. E.* Enzyme entrapment in liposomes // FEBS Lett. — 1971. — V. 14, N 2. — P. 95–99.
4. *Rahman Y. E., Rosenthal M. W., Cerny E. A., Moretti E. S.* Preparation and prolonged tissue retention of liposome encapsulated chelating agents // J. Lab. Clin. Med. — 1974. — V. 83, N 4. — P. 640–647.
5. *Lasic D. D.* Kinetic and thermodynamic effects on the structure and formation of phosphatidylcholine vesicles // Hepatology. — 1991. — V. 13, N 5. — P. 1010–1012.
6. *Ulrich A. S.* Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles // Bioscience Reports. — 2002. — V. 22, N 2. — P. 129–150.
7. *Moghimi S. M.* Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice // Pharm. Rev. — 2001. — V. 53. — P. 283–318.
8. *Gregoriadis Ed. G.* Liposomes as Drug Carriers. — New York, 1988. — 885 p.
9. *Knight Ed. C. G.* Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications. — Amsterdam, 1981. — 497 p.
10. *Ostro Ed. M. J.* Liposomes. — New York, 1983. — 393 p.
11. *Shaw A. W.* Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs // FEBS Lett. — 2004. — V. 556. — P. 260–264.
12. *Несытова Н. Ю.* Тенденции в развитии исследований в области липосом: обзор патентной литературы // Вестн. АМН СССР. — 1990. — С. 8–19.
13. *Le Bang Son J.* Liposome // Liposome Res. — 1998. — V. 8. — P. 78.
14. *Dapergolas G.* Penetration of target areas in the rat by liposome — associated bleomycin, glucose oxidase and insulin // FEBS Lett. — 1976. — V. 63. — P. 235–239.
15. *Blume G.* Роль липосом и их применение в перспективе // SOFW J. Eng. Vers. — 2003. — V. 8. — С. 10–14.
16. *Эрнандес-Хименс Е. И.* Взаимодействие липосом с эритроцитами: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М.: Рос. гос. мед. ун-т, 1995. — 22 с.
17. *Кобринский Г.* Липосомы в медицине // Наука и жизнь. — 1988. — № 6. — С. 126–129.
18. *Juliano B. L.* The effect of particle size and change on the clerance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs // Biochem. Biophys. Res. Com. — 1975. — V. 63. — P. 651–658.
19. *Бурханов С. А.* Липосомы в медицине // Вестн. АМН СССР. — 1990. — № 8. — С. 47–50.
20. *WHO/CDS/NTD/IDM/2007.4.* Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis, Rome, Italy, 16 April 2005: World Health Organization. — 18 p.
21. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин» / Матер. наук.-практ. конф. «Харчові добавки, інгредієнти, БАДи: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв». — К.: Знання, 2003. — С. 68–70.
22. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Аспекты применения подсолнечного лецитина в пищевой промышленности // Одес. нац. акад. пищ. техн. — 2009. — Вып. 36, Т. 2. — С. 177–179.
23. *Пат. № 46226.* Спосіб одержання 50% розчину фосфатидилхолину (L-α-лецитину) / Шульга С. М., Глух А. І., Гаманухо В. І., Глух І. С., Школа О. І. — Опубл. 10.12.2009.
24. *Микитюк В. В., Шульга С. М., Глух І. С.* Лецитин як фактор одержання продукції тваринництва. — К.: Освіта України, 2010. — 114 с.
25. *Shulga S. M., Glukh I. S.* Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions from sunflower / Abstracts of posters 10th ILPS Phospholipid Congress, Rotterdam, the Netherlands, 16–18 September 2011. — P. 6.
26. *Shulga S., Glukh I.* Liposomes and liposomal nanoememulsions from sunflower // Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology (23-26 September 2012, Istanbul, Turkey), New biotechnology. — V. 29. — Issue S. — P. S127.
27. *Shulga S., Glukh I.* Technology of dry powder sunflower lecithin for food, Feed and Pharmaceuticals / Lecithin from Alternative Sources, The 103rd AOCS Annual Conference & Expo in Long Beach, California, USA, April 29 — May 2, 2012. — PHO 1.
28. *Cabezas D. M., Diehl B., Tomás M. C.* Sunflower Lecithin: Application of a Fractionation Process with Absolute Ethanol // J. Amer. Oil Chem. Soc. — 2009. — V. 86. — P. 189–196.
29. *Nieuwenhuyzen W., Tomás M. C.* Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies // Europ. J. Lipid Science Technol. — 2008. — V. 110 — P. 472-486.
30. *Пат. SU 1289440 A1.* Способ получения фосфолипидов / Мельничук Д. А., Лишко В. К., Стефанов А. В. и др. — Опубл. 15.02.1987, Бюл. № 6.
31. *Шульга С. М., Глух И. С., Гаманухо В. И. и др.* Создание производства пищевой и биологически активной добавки «Лецитин» из подсолнечного фосфатидного концентрата / Сб. статей науч.-практ. конф. с междунар. участием «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль биологически активных пищевых добавок в обеспечении здоровья населения». — Днепропетровск, 2003. — С. 96–97.

32. *Пат. № 81822.* Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату / Шульга С. М., Глух І. С., Глух А. І., Гаманухо В. І. — Опубл. 11.11.2008.
33. *Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов О. Л. та ін.* Порівняльна характеристика хроматографічних методів визначення складу соняшникового лецитину: Метод. рекомендації. — Дніпропетровськ, 2012. — 70 с.
34. *Шульга С. М., Глух А. И., Глух И. С. и др.* Разработка технологии получения сухого лецитина из фосфатидного концентрата подсолнечника // Наука та інновації. — 2012. — Т. 8, № 5. — С. 62-71.
35. *Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов А. Л. и др.* Современные представления о биологических свойствах лецитина: Метод. пособие. — Днепропетровск, 2010. — 36 с.
36. *Шульга С. М., Глух А. И., Глух И. С. и др.* Внедрение технологии и создание производства эссенциальных фосфолипидов (50%-й раствор фосфатидилхолина) из подсолнечного фосфатидного концентрата // Наука та інновації. — 2010. — Т 6., № 1. — С. 76–78.
37. *Дзяк Г. В., Шульга С. М., Дроздов А. Л. и др.* Биологические свойства лецитина // Мед. перспективи. — 2010. — Т. 15, № 2. — С. 123–135.
38. *Шульга С. М., Глух І. С., Дроздов О. Л.* Біологічні властивості лецитину з соняшнику / Наук. праці Одес. нац. акад. харч. технологій, Одеса. — 2012. — Вип. 42, Т. 1. — С. 234–238.
39. *Allen T. M.* Drugs // Suppl. — 1997. — V. 4. — P. 8–14.
40. *Torchilin V. P.* Liposomes as delivery agents for medical imaging // Mol. Med. Today. — 1996. — V. 2, N 6. — P. 242–249.
41. *Torchilin V. P.* Targeting of liposomes within cardiovascular system // J. Liposome Res. — 1997. — V. 7, N 4. — P. 433–435.
42. *Dass C. R., Walker T. L., Burton M. A., Decruz E. E.* Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes // J. Pharm. Pharmcol. — 1997. — V. 49, N 10. — P. 4671–4674.
43. *Alico* S. *F.* Liposome // Biochem. Pharmacol. — 1997. — V. 54. — P. 9–13.
44. *Harrington K. L.* Liposomes as vehicles for targeted therapy of cancer. — Part 2: Clinical development // Clin. Oncol. — 2000. — V. 12. — P. 16–24.
45. *Липосомы* в биологических системах: пер. с англ. / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. — М., 1983. — С. 36–39.
46. *Liposome* technology / Ed. by G. Gregoriadis. Boca Raton (Fla). — 1984. — V. 13. — 229 p.
47. *Bermudez M.* Liposome // J. Liposome Res. — 1996. — V. 6, N 1. — P. 221.
48. *Medda S., Das N., Mahato S. B. et al.* Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis // Ind. J. Biochem. Biophys. Jun. — 1995 — V. 32, N 3. — P. 147–151.
49. *New R. C.* Liposomes: A Practical Approach. — IRL Press, Oxford, 1989. — 161 p.
50. *Lasic D. D.* Liposomes: From Physics to Application. — Amsterdam, New York: Elsevier, 1993. — 575 p.
51. *Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C.* Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // J. Mol. Biol. — 1965. — V. 13, N 1. — P. 238–252.
52. *Huang C.-H.* Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics // Biochemistry. — 1969. — V. 8, N 1 — P. 344–352.
53. *Barenholzt S. Y., Amselem L. D.* A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes)—French press // FEBS Lett. — 1979 — V. 99, N 1. — P. 210–214.
54. *Mayhew E., Lazo R., Vail W. J. et al.* Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — V. 775, N 2. — P. 169–174.
55. *Brandl M., Bachmann D., Drechsler M., Bauer K. H.* Lipopsome preparation by a new high pressure homogenizer Journal of Drug Delivery 9 Gaulin Micron LAB 40 // Drug Devel. Ind. Pharm. — 1990. — V. 16, N 14. — P. 2167–2191.
56. *Olson F., Hunt C. A., Szoka F. C.* Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonatemembranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1979. — V. 557, N 1. — P. 9–23.
57. *Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R.* Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure // Ibid. — 1986. –V. 858, N 1. — P. 161–168.
58. *Schneider T., Sachse A., Rossling G., Brandl M.* Largescale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device. // Drug Devel. Ind. Pharm. — 1994. — V. 20, N 18. — P. 2787–2807.
59. *Batzri S., Korn E. D.* Single bilayer liposomes prepared without sonication // Biochim. Biophys. Acta. — 1973. — V. 298, N 4. — P. 1015–1019.
60. *Lasic D. D.* Mechanisms of liposome formation // J. Liposome Res. — 1995. — V. 5, N 3. — P. 431–441.
61. *Kremer J. M. H., Esker M. W. , Pathmamanoharan C., Wiersema P. H.* Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method // Biochemistry. — 1977. — V. 16, N 17. — P. 3932–3935.
62. *Maitani Y., Soeda H., Junping W., Takayama K.* Modified ethanol injection method for liposomes containing -sitosterol -d-glucoside // J. Liposome Res. — 2001. — V. 11, N 1. — P. 115–125.
63. *Stano P., Bufali S., Pisano C. et al.* Novel camptothecin analogue (Gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method // Ibid. — 2004. — V. 14, N 1–2. — P. 87–109.

64. *Naeff R.* Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale // Advanc. Drug Del. Rev. — 1996. — V. 18, N 3. — P. 343–347.
65. *Wagner A., Vorauer-Uhl K., Kreismayr G., Katinger H.*The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method // J. Liposome Research. — 2002. — V. 12, N 3. — P. 259–270.
66. *Wagner A., Vorauer-Uhl K., Kreismayr G., Katinger H.* Enhanced protein loading into liposomes by the multiple crossflow injection technique // Ibid. — 2002. — V. 12, N 3. — P. 271–283.
67. *Wagner A., Vorauer-Uhl K., Katinger H.* Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects // Europ. J. Pharm. Biopharm. — 2002. — V. 54, N 2. — P. 213–219.
68. *Wagner A., Platzgummer M., Kreismayr G. et al.* GMP production of liposomes—a new industrial approach // J. Liposom Research. — 2006. — V. 16, N 3. — P. 311–319.
69. *Wagner A., Stiegler G., Vorauer-Uhl K. et al.* One step membrane incorporation of viral antigens as a vaccine candidate against HIV // Ibid. — 2007. — V. 17, N 3–4. — P. 139–154.
70. *Deamer D., Bangham A. D.* Large volume liposomes byan ether vaporization method // Biochim. Biophys. Acta. — 1976. — V. 443, N. 3. — P. 629–634.
71. *Turanek J., Kasna A., Zaluska D., Neca J.* Preparation of sterile liposomes by proliposome-liposome method // Meth. Enzymol. — 2003. — V. 367. — P. 111–125.
72. *Turanek J., Zaluska D., Neca J.* Linkup of a fast protein liquid chromatography system with a stirred thermostatedcell for sterile preparation of liposomes by the proliposomeliposome method: application to encapsulation of antibiotics, synthetic peptide immunomodulators, and a photosensitizer // Anal. Biochem. — 1997. — V. 249, N 2 — P. 131–139.
73. *Szoka F. Jr., Papahadjopoulos D.* Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // PNAS USA. — 1978. — V. 75, N 9. — P. 4194–4198.
74. *Frokjaer S.* Double emulsion vesicles // Liposomes. A Practical Approach, R. R. C. New, Ed.: IRLPress, Oxford, UK, 1989.
75. *Anholt R. R. H.* Solubilization and reassembly of the mitochondrial benzodiazepine receptor // Biochemistry. — 1986. — V. 25, N 8. — P. 2120–2125.
76. *Jackson M. L., Litman B. J.* Rhodopsin-phospholipid reconstitution by dialysis removal of octyl glucoside // Ibid. — 1982. — V. 21, N 22. — P. 5601–5608.
77. *Driessen A. J. M., Wickner W.* Solubilization and functional reconstitution of the protein-translocation enzymes of Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sciences USA. — 1990. — V. 87, N 8. — P. 3107–3111.
78. *Schurtenberger P., Mazer N., Waldvogel S., Kanzig W.* Preparation of monodisperse vesicles with variable size by dilution of mixed micellar solutions of bile salt and phosphatidylcholine // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — V. 775, N 1. — P. 111–114.
79. *Brunner J., Skrabal P., Hauser H.* Single bilayer vesicles prepared without sonication: physico chemical properties // Ibid. — 1976. — V. 455, N 2. — P. 322–331.
80. *Goldin S. M.* Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis // Biochemistry. — 1979. — V. 18, N 19. — P. 4173–4176.
81. *Milsmann M. H. W., Schwendener R. A., Weder H. G.* The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis // Biochim. Biophys. Acta. — 1978. — V. 512, N 1. — P. 147–155.
82. *Kagawa Y., Racker E.* Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. Reconstitution of vesicles catalysing adenosinetriphosphate exchange // J. Biol. Chem. — 1971. — V. 246. — P. 5477–5487.
83. *Кузякова Л. М.* Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2, Химия. — 2005. — Т. 46, № 1. — С. 74–79.
84. *Кузнецов О. К., Киселев О. И., Автушенко С. С.* Экспериментальное изучение сухой липосомальной инактивированной гриппозной вакцины (ЛИГВ) для перорального введения // Совр. вакцинология. — 1998. — С. 107–108.
85. *Тихонов Н. Г.* Лечение бронхопневмонии с/х животных липосомальным стрептомицином // Проблемы биол. экол. безопасности: Матер. междунар. науч. конф. Оболенск, 22–24 мая 2000 г. — С. 147.
86. *Таганович А. Д.* Получение липосом из природных липидов и результаты исследования их влияния на клетки легких // http://www.med.by/dmn/book.php?book=04-13_1
87. *Пат. РФ 2306936, А61К 31/7105; А61К 9/127.* Липосомальный индуктор интерферона / Золин В. В., Колокольцов А. А., Таргонский С. Н., Бажутин Н. Б. — Заявл. 25.02.2004; Опубл. 10.08.2005.
88. *Aebi H.* Catalase *in vitro* // Methods Enzymol. — 1984. — V. 105. — P. 121–126.
89. *Пат. РФ 2216315 С2, 7А 61К 9/127.* Способ получения липосом / Грегориадис Грегори, Зади Брахим, Джайасекера Прамукх Налака. — Заявл. 16.06.1999; Опубл. 20.11.2003.
90. *Пат. РФ № 93029233.* Липосомная везикула, стабильная при хранении / Шанская А. И., Яковлева Т. Е., Булушева Е. В. и др. — Заявл. 04.06.1993; Опубл. 20.07.1997.
91. *Пат. РФ № 96119991.* Липосомы с повышенной инкапсулирующей способностью / Хироси Кикути, Кийото Яти. — Опубл. 27.12.1998.
92. *Пат. РФ № 96110886.* Липосомы, содержащие материалы, состоящие из частиц / Грегори Грегориадис, София

Джордж Антимисиарис, Ихсан Гурсел. — Заявл. 07.10.1994; Опубл. 10.02.2000.
93. *Пат. РФ № 2000110113.* Липосомные аэрозоли с малым размером частиц для доставки противораковых лекарственных препаратов / Найт Дж. Вернон, Гилберт Брайан, Волдреп Дж. Клиффорд и др. — Заявл. 23.09.1998; Опубл. 20.02.2004.
94. *Красильников В. Н.* Липосомы: структура, свойства, производство. — СПб.: Торгово-экон. ин-т. — 147 с.
95. *Williams W. P.* Liposomes and Pro-Liposome Method // SOFW J. — 1992. — V. 118. — P. 377–378.
96. *New R. C.* Preparation of liposomes. In: Liposomes, a practical approach, ed. by RR. — C. New. Oxford etc. IRZ press. — 1990. — P. 33–104.
97. *Payne N. J.* Characterizftion of proliposomes // J. Pharm. Sci. — 1986. — V. 75, N 4. — P. 330–333
98. *Пат. РФ № 2130771 C2, 6 A 61 K 9/127.* Способ получения липосомальных препаратов / Автушенко С. С. — Заявл. 01.06.1998; Опубл. 27.05.1999.
99. *Jung B. H., Chung S. J., Shim C. K.* Proliposomes as prolonged intranasal drug delivery systems // STP Pharma Sciences. — 2002. — V. 12, N 1. — P. 33–38.
100. *Meyer L.* Liposomes // The Pro-Liposome Approach. Publication 14 September. — 1993. — P. 43.
101. *Пат. РФ № 2217129 C2, 7 A 61 K 9/127.* Способ получения липосомальных препаратов / Сорокин Е. М., Смирнова Л. Ф., Михайлова О. Г. и др. — Заявл. 28.10.2002; Опубл. 27.11.2003.
102. *Пат. РФ № 2162689 C2, 7 A 61 K 9/127, 9/72, 31/56, 47/44.* Пролипосомальные порошки для ингаляции / Катарина Бюстрем, Пер-Гуннар Нильссон. — Заявл. 20.12.1995; Опубл. 10.02.2001.
103. *Сорокоумова Г. М.* Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде. — М.: МИТХТ, 2000. — 100 с.
104. *Perrett S.* Method for the Preparation of Liposomes for Pharmaceutical Applications // J. Pharm. Pharmacol. — 1991. — V. 43. — P. 154–161.

ЛИПОСОМЫ И НАНОСОМЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРОИЗВОДСТВО

С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: shulga5@i.ua

Липосомы — полые частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной. Относятся к большому семейству везикулярных (пузырьковых) структур, образованных амфифильными молекулами. Липосомы, состоящие из одного или нескольких бислоев фосфолипидов, впервые были описаны в середине 60-х годов. За сравнительно короткий срок липосомы превратились из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, в объект интенсивных научных исследований и различных практических применений. Сегодня доступно значительное количество лабораторных методик создания липосом и сравнительно небольшое количество технологий, используемых в промышленности. Однако большинство этих методов имеют ограничения при включении биологически активных веществ в липосомы вследствие чувствительности последних к механическим и/или химическим повреждениям. В обзоре охарактеризованы структура липосом, их свойства, методы создания и масштабирования в промышленном производстве.

Ключевые слова: липосомы, фосфолипиды, фосфатидилхолин, наносомы, везикулы.

LIPOSOMES AND NANOSOMES: STRUCTURE, PROPERTIES, PRODUCTION

S. M. Shulga

SO «Institute for food biotechnology and genomics NAS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

E-mail: shulga5@i.ua

Liposomes are hollow particles which content is limited to a lipid membrane. They belong to a large family of vesicular (bubble) structures formed by amphiphilic molecules. Liposomes consisting of one or more phospholipid bilayers were first described in the mid 60s. In a relatively short period liposomes transformed from a simple model that mimics the cell membrane into the object of active research and variety of practical applications. Currently a large number of laboratory techniques create liposomes and relatively small number of technologies used in the industry are available. However, most of ones have limitations in conditions of the biologically active substances inclusion in liposomes due to their sensitivity to mechanical and/or chemical damage. In reviews the liposomes structure, properties and methods for creating and scaling in industrial production are described.

Key words: liposomes, phospholipids, phosphotydilholin, nanosomes, vesicles.

2.2. Визначення стабільності ліпосом

UDK 547.953:615.012 **doi: 10.15407/biotech9.01.087**

LIPOSOME STABILITY DEPENDENCE ON FATTY ACID LECITHIN COMPOSITION AND SUNFLOWER PHOSPHOLIPIDS

S. M. Shulga

State Enterprise "Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine", Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Received 30.09.2015

Phospholipids play an important physiological role being components of biologically active membranes of animals and humans nerve cells. The conditions of separation of sunflower phospholipids have been defined by the method of high performance liquid chromatography. Procedurer for quantitative determination of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidyl inositol has been developed. It was done under normal phase mode and according to external standards and the order of exit. Phospholipid composition of sunflower lecithin has been identified and phospholipid fatty acid composition has been determined by tandem mass spectrometry. The presence of antioxidant α-tocopherol has been determined in liposomes composition, stipulating for maintaining stability of liposomal substance. Membrane-protecting effect of α-tocopherol is associated with its participation in arrangement of the membrane structure through direct interaction of its side isodental chain with polyunsaturated fatty acids of phospholipids, which leads to denser packaging of mitochondrial membranes and rising of increased resistance to lipid peroxygenation process effect.

Key words: lecithin, sunflower phospholipids, fatty acids, liposomes.

The term "lecithin" was used for lipids, received from egg yolk. Later, this term was applied as a synonym for specific phospholipid — phosphatidylcholine, which is the main component of the fraction of egg yolk and soybeans phosphatides. Having regards to some medical issues, the term "lecithin" was referred to -1,2-diacylglycero-3-phosphatidylcholine (L-α-lecithin). In contrast to this definition, in the industry and trade (particularly in the technology of drugs and food additives) the term «lecithin» is used to determine the mix of neutral lipids (triglycerides, a small amount of "free" fatty acids and sterols), polar lipids (phospho — and glycolipids) and carbohydrates.

At present, the most optimal is industrial use of liposomal preparations of natural phospholipids (soybeans, flax, canola, corn, sunflower, hazelnut, egg yolks, milk, salmon), since the introduction of liposomes are based on natural raw lecithin or phosphatidylcholine — ether phosphoric acids and fatty acids — is not associated with the risk of toxicity, immunogenicity and allergic reactions.

The stability of the liposomes can conveniently be divided into physical, chemical and biological stability being interrelated. As a rule, the term of liposomes stability is determined by their physical and chemical stability (uniformity of size distribution, encapsulation efficiency and minimal degradation of all components respectively). Preparations in liposomal form can become stable through optimizing their size distribution, pH and ionic strength, as well as due to addition of antioxidants and chelating agents [1].

Considering the fact that phospholipids usually form bilayer basis their chemical stability is deemed very important [2–4]. Two types of chemical reactions can affect the stability of the phospholipid bilayer: hydrolysis of esters that connect fatty acids with glycerol and unsaturated lipid acyl chains peroxygenation (if any).

The oxidation and hydrolysis of lipids can lead to liposomal preparations quality

degrading [4, 5]. In addition, physical processes like aggregation/flocculation affect the shelf life of liposomes, and may lead to loss of biologically active targeting substances and changes in the liposomes size [6]. The biological stability of liposomes depends on the presence of structures like proteins which interact with liposomes, and the route of liposomes entry. Permeability and stability of the liposomes are dependent on the lipid bilayer rigidity. The choice of lipids, in turn, depends on the temperature of the phase transition, which depends on the length of acylic chain. Gel-fluid phase transition occurs in a narrow temperature range for pure lipid (so-called phase transition temperature T_C). T_C depends on the length of the side chains and the degree of unsaturation of fatty acids as well as the polarity of the main groups. Lipids with long acyl chains are often used to generate liposomes, as they have a high phase transition temperature. However, the stability of liposomes cannot be achieved using only one type of lipids. The stability of liposomes can be achieved through a combination of lipids or inclusion of other substances [1]. Liposomal preparations of phospholipid nature start to be used widely in medical practice, so the vital issue of this new class of drugs deals with raw materials sources and methods of phospholipids obtaining. There are several groups of phospholipids that can be used in the preparation of liposomes, namely: phospholipids from natural raw materials, modified natural materials, semi-synthetic, synthetic, and those with natural "heads" [7–9]. Currently, there exist two approaches to solving the problems of availability of these compounds. The first approach is bio-inspired or chemical (enzymatic) synthesis (and combinations of these methods). The second is the selection of phospholipid fractions and their mixtures containing natural raw materials using bio-inspired methods.

At present, the use of natural phospholipids in production of liposomal preparations (from soybeans, flax, rapeseed, corn, sunflower, hazelnut, yolks of eggs, the milt of salmonid fishes) sounds the most optimal, since the introduction of liposomes based on natural raw materials involves no risk of toxicity, immunogenicity and allergic reactions [7, 9]. In addition, there are no restrictions on the use of natural lecithin in food products, cosmetics and medicines both in the European Union and in the instructions of Food and Drug Administration, medicines and cosmetics (FDA) of the USA [3, 10]. The macro and fatty acid composition of fat-free sunflower lecithin and sunflower lecithin impact on stability of liposomes have been researched in this scientific paper.

Materials and Methods

The objects being researched. Dry sunflower fat-free lecithin — a mixture of phospholipids, phosphatidylcholine (PC), extracted with ethanol or isopropanol — all belong to "PJSC DOIREA" Ukraine.

Instruments and equipment. High performance liquid chromatography (HPLC) "Dionex Ultimate 3000", Dionex. The following items enter into the chromatograph composition: pump LPG-3400A; spectrophotometric detector VWD-3400; Column heating oven TCC-3000; Autosampler WPS; column Ultra ll Silica, 3 μm, 100×4.6 mm. Triple quadrupole mass spectrometer API 3200 LC/MS/MS System, AB Sciex. Water clean-up system Direct-Q, Millipore. Weigh-scales Radwag, XAS 220/C.

Reagents and solvents. Deionized water; chloroform, HPLC grade, Merck; Methanol, HPLC grade, Merck; orthophosphate acid, HPLC grade, Merck; acetonitrile, HPLC grade, Merck; hexane, HPLC grade, Merck; benzene, HPLC grade; standard version of phospholipids (Phospholipid Mixture for HPLC from Soybean, Supelco, P3817-1VL, varied conc. in chloroform, L-α-PC 1500 mkg/ml, L-α-PE 1200 mkg/ml, L-α-PI (As ammonium salt), 900 mkg/ml, L-α-LPC 300 mkg/ml); ethanol farm.; 300 mkg/ml); TLC Silica gel 60, Merck; Pro Analysi; Aluminium oxide for chromatography, basic. Brockmnn I, 50–200 μм. Acros Organics.

Preparative discharging of phosphatidylcholine. It was found in previous research that phospholipids are the best separated using basic aluminum oxide. When PC discharging through preparative chromatography using basic aluminum oxide is performed. In this case aluminum purity equals more than 90% and lysophosphatidylcholine (LPC) can be extra mixed. Column is used to separate the substances, the ratio of length to inner diameter is equal to 20. Dense layer of cotton wool 1 cm thick and paper filter of relevant diameter was placed at the bottom. The column is filled with a suspension of basic aluminium oxide in a mixture of chloroform: methanol (1:1) for 1–2 days prior to separation of phospholipids and filter paper was placed on top. The portion of 30 mg of phospholipids per 1 g of dry sorbent was taken to separate the mixture. Phospholipids were dissolved

in a mixture of methanol-chloroform (1:1) and then brought into the column. PC with admixture of LPC was washed with two full columns volumes. 75% of the first volume was rejected. As soon as PC was discharged, the column was washed with one volume of the same mixture. Phosphatidylethanolamine (PE) mixed with phosphatidyl serine (PS) was washed with 2–3 volumes of ethanol-chloroform-water (5:2:2). The first volume was rejected. Both the effluents were evaporated to dryness with a rotary evaporator. The discharged volume was 80–90% in relation to the theoretically possible.

High performance liquid chromatography (HPLC). Detection of phospholipids followed by HPLC separation is generally carried out by absorption in the ultraviolet region of the spectrum or refractometrically. Phospholipids can be identified chromatographically both in native form and in the form of derivatives. Majority of membrane, barrier and superficial lipids have absorption band in the ultraviolet region [11], but the molar extinction factor of saturated lipids and monoene lipids is relatively small. Only lipids with a high content of unsaturated bonds have a significant extinction factor. Unmodified lipids are commonly found in absorption band of the UV region in the range of 203–213 nm.

Since a large number of organic solvents are strongly absorbed in the 200–215 nm range, a mixture of acetonitrile/ methanol/ water or hexane/isopropanol/water is used most often. Usually selectivity is increased as a result of appropriate selection of the effluents and by adding thereto acids or other ion modifiers. The mixture of acetonitrile, methanol and concentrated phosphoric acid and water was used as effluent for chromatographic separation of phospholipids through the column Ultra ll Silica, 3 micron, 100 × 4.6 mm, which enabled to determine quantitative volume of main sunflower lecithin components. Based on the performed tests, it was found that the following composition of mobile phase was the best to separate the substances as A:B = 99.6:0.4, where A — CH_3CN:CH_3OH: H_3PO_4 = 490:5:5, B — H_2O. The effluent was prepared as follows: 490 ml of acetonitrile, 5 ml of methanol and 5 ml of concentrated orthophosphoric acid were carefully mixed in a separate flask destined for mobile phase. Conditioned water was poured into another flask. The components A and B were mixed using a pump based on previously set program (isocratic mode). Minor variations in temperature (20–25 °C) practically produced no effect on the obtained results. The optimum indices were the flow rate — 1 ml/min and the detection wavelength — 208 nm. The sample was pre-filtered through polytetrafluoroethylene (PTFE) filter which resembled a spray nozzle with a diameter of pores of 0.22 microns. After each analysis made, the column was washed for 10–15 min at a flow rate of 1 ml/min.

Tandem mass spectrometry. Identification of phospholipids in sunflower lecithin was performed using tandem mass spectrometry method. Ionization method presented electrochemical spraying in the positive (identification of phosphatidylcholine) and in the negative (other phospholipids) mode (ESI^+, ESI^-). The identification of phospholipids groups was performed based on the availability of molecular ions of substances. Fatty acid composition and the presence of specific structural fragments (residues of inositol, glycerol, etc.) were confirmed based on the presence of characteristic product ion fractions-spectrum fragmentation of parent ions (in MS2 spectra). The group of phosphatidylcholines was identified in positive ionization mode through scanning product ion precursor according to ion ratio mass/charge 184 (the remainder of phosphatidylcholine). The Solution of sunflower lecithin with concentration of 0.05 mg/ml in chloroform system — a solution of formic acid 10 mmol/l in methanol = 1: 1 were injected with infusion method. Ionizing voltage equaled 4500 V, the source temperature — 300 °C, DP 50, CE 30. Full scanning spectra were in the mass range from 50 to 1000 a.o.m.

The formation of liposomes. Liposomes were prepared using an ultrasonic homogenizer with sonication method (Techpan UD-20) at a frequency of 22 kHz and ± 0.165 extruded using a hand extruder LiposoFast-Basic, AVESTIN. Preparing solutions of phospholipids followed the methods of [7].

The presence of α-tocopherol was determined in accordance with GOST 30417-96. Vegetable oils. Methods for determination of vitamins A and E mass fractions.

Statistical analysis of the results was made by calculating averages the average rates, their standard deviations and errors using Student's test. The differences were considered statistically-valid at $P < 0.05$.

Results and Discussions

"Raw" vegetable oils in addition to spare lipids (acetylglycine) include other groups of lipids (phospholipids, waxes) as well as products of hydrolysis and oxidation of lipids and the substances that determine the color, smell and taste of oil. Unwanted components of oil raw material are removed when refining. Oil refining begins with water treatment — hydration (extraction of hydrophilic compounds, primarily phospholipids). Oil subjected to heating and vigorous stirring is mixed with the required amount of water. The mixture is aged to ensure coagulation of phospholipids (phosphatides) and phosphatide emulsion is separated from hydrated oil. Phosphatides (phosphatide concentrate or liquid lecithin) being dried under vacuum to a moisture content of 90% are considered commercial products. Fat-free lecithin is obtained from phosphatide concentrate by extraction with acetone, the lecithin of the kind is then dried and grinded. Table 1 shows the main characteristics of fat-free lecithin obtained according to the procedure [7] from sunflower phosphatide concentrate by extraction with acetone. As shown in the Table. 1 dry fat-free lecithin phosphatide is actually isolate (containing 98% phosphatides). Phospholipid composition of obtained fat-free sunflower lecithin (Fig. 1) was defined using HPLC method. The chromatogram shows that the peaks of the main components are symmetrical.

Regarding the substances whose content is relatively low, the peaks have slightly extended rear slope, which may indicate these compounds high affinity to silica gel. They could be lysoforms of phospholipids. It is clearly seen that several substances whose retention time is less than phosphatidyl inositol (PI) retention time, were not divided. It was established previously by TLC [12] that the sunflower lecithin contains a significant amount (at PC) phosphatidic acid (PA). Using thin-layer chromatography [12], it has been earlier discovered that sunflower lecithin contained a significant ammount of phosphatidic acid (at PC level). However, after the high intensity peaks PI, other peaks are not observed, except identified ones. Probably, PA emerges earlier as compared with PI.

The time span of components retention is slightly larger than that one of the standard substances, which can be attributed to different fatty acid composition of soybean phospholipids (the standard is made from soy phospholipids) and sunflower phospholipids.

Owing to the fact that mainly phosphatidylcholine solutions are used to generate liposomes, extraction was conducted using ethyl and isopropyl alcohol. Chromatogram of 50% PC solution in ethanol given in Fig.2. It shows that PC content in the

Table 1. **Key features of fat-free sunflower lecithin**

Index name	Description and rate	Results
External view	Loose powder mass without impurities	Relevant
The smell and taste	Tasteless and odorless. Faint specific taste and smell of sunflower oil is allowed	Relevant
Color	From yellow-gray to fawn colored	Relevant
Moisture content,%, not exceeding	1.4	0.4
Oil content, %, not exceeding	1.5	1.0
Peroxide value mmol (½O_2)/kg, not exceeding	10.0	1.5
Acid value, mg KOH/g, not exceeding	32.0	15.0
Mass concentration of substances insoluble in toluene, %, not exceeding	2.0	0.6
Mass concentration of phospholipids, %, not exceeding	95.0	98.0
pH of 1% aquatic solution	6 — 7	6.4

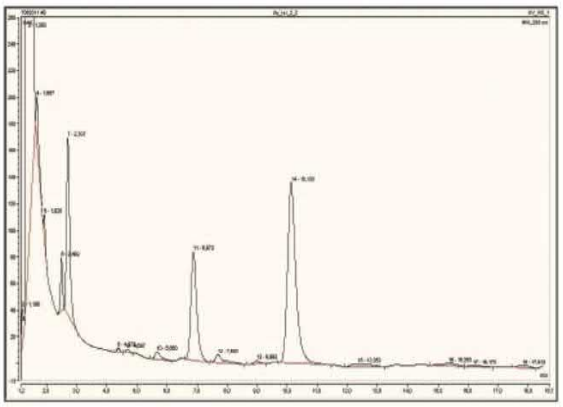


Fig. 1. **Chromatogram of sunflower lecithin**
Conditions of chromatography: v = 1 ml / min, t = 20 °C, λ = 208 nm column: Ultra ll Silica, 3 micron, 100×4.6 mm mobile phase: isocratic mode, A:B = 99:1; *A* — CH_3CN:CH_3OH:H_3RO_4 = 490:5:5 (vol.%) B — H_2O. Retention time span: 2,707min — PIX; 6.873 min — PE; 1 min 0.133 — PC.

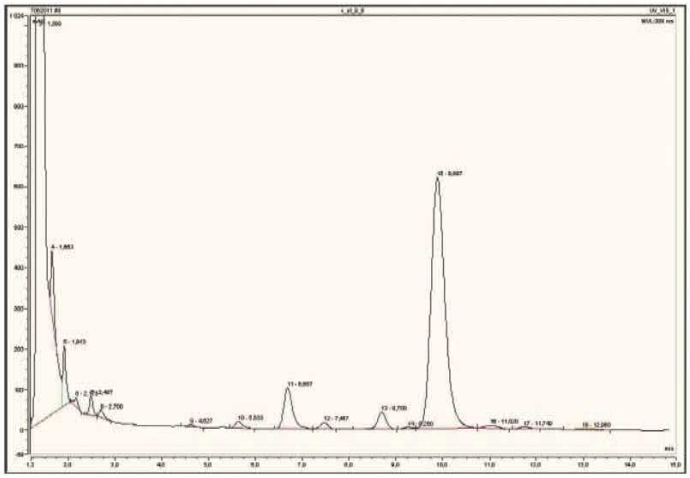


Fig. 2. **Chromatogram for PC (50% solution) extracted from sunflower lecithin by ethanol alcohol**
Conditions of chromatography: v = 1 ml / min, t = 20 °C, λ = 208 nm column: Ultra ll Silica, 3 micron, 100×4.6 mm mobile phase: isocratic mode, A:B = 99: 1; A — CH_3CN:CH_3OH:H_3PO_4 = 490: 5: 5 (vol.%), B — H_2O. Retention time spans: 2.460 min — PI; 5.973 min — PE; 8.753 min — PC

extract is big enough, but it is poorly cleared. A certain number of PE is available. The time span of components retention is a little more as compared with the standard, but slightly less than that one for the components of fat free lecithin. This can be explained by the fact that the sample resembled a 50% solution in ethanol and its trace amounts play some part in the division.

Chromatogram of 50% PC solution in isopropyl alcohol shown in Fig. 3 indicates that the PC content in the extract is large, but admixtures are still present. The main admixture is PE. However, as compared to the extract in ethanol, other contaminants are fewer in number. Retention time spans do not quite match the standard mixture retention time spans, they are somewhat smaller. This is explained by isopropanol impact.

Preparative-scale chromatography was used to obtain pure PC isolated from fat-free lecithin using a column with aluminum oxide. The chromatogram for PC, obtained with this method is given in Fig. 4.

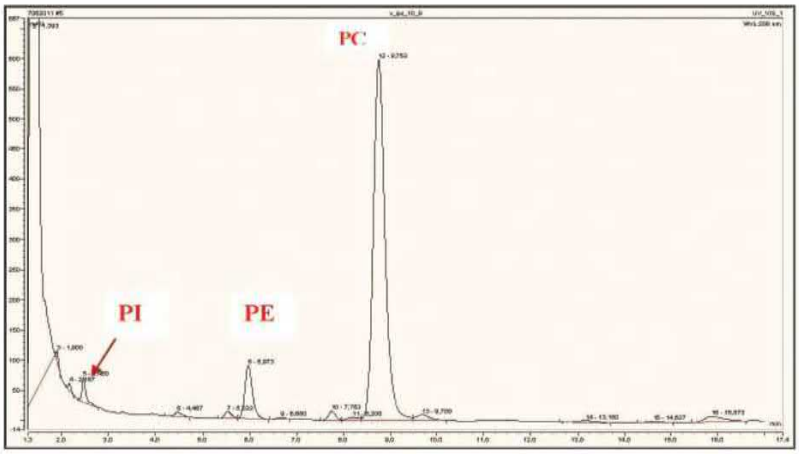


Fig. 3. **Chromatogram for PC (50% solution) extracted from sunflower lecithin by isopropyl alcohol**
Conditions of chromatography: v = 1 ml / min, t = 20 °C, λ = 208 nm column: Ultra ll Silica, 3 micron, 100×4.6 mm mobile phase: isocratic mode, A:B = 99:1; A — CH_3CN:CH_3OH:H_3RO_4 = 490:5:5 (vol.%), B — H_2O. Retention time spans: 2.460 min — PI; 5.973 min — PE; 8.753 min — PC

Table 2. **The content of phospholipids in fat-free sunflower lecithin and cleared PC**

Sample	Phospholipid	Content of masses%
Dry fat-free lecithin	PC	29.4 ± 0.3
	PE	12.5 ± 0.4
	PI	19.2 ± 0.5
The extract of PC in ethanol	PC	63.7 ± 0.1
	PE	6.7 ± 0.2
	PI	1.4 ± 0.2
The extract of PC in isopropylalcohol	PC	48.5 ± 0.3
	PE	4.4 ± 0.1
	PI	2.2 ± 0.1
PC, cleared by preparative chromatography	PC	97.8 ± 0.8

Table 2 shows the quantitative amount of phospholipids in a dry fat-free lecithin, 50% extracts with isopropanol and ethanol, as well as in PC, cleared by preparative chromatography.

Identification of phospholipids in sunflower lecithin and phospholipids fatty acid composition was performed with tandem mass spectrometry. Electrochemical spraying in the positive (identification of phosphatidylcholine) and negative modes (identification of other phospholipids) was used. The analysis results of phospholipids composition determining with tandem mass spectrometry used under negative ionization mode is shown in Fig. 5. PI, PE and PA, and phosphoglycerol (PG) and their respective lysoforms were identified by the given spectrum by molecular ion masses.

The range of ions in positive ionization is shown in Fig. 6. PC, which is invisible in negative ionization, is clearly seen in this case. The weight of its main molecular ions was comprised 782.7 and 784.7. The molecular weight of choline balance was 520.4, confirming that they are the forms of phosphatidylcholine. The analysis results to deal with sunflower lecithin are provided in Table 3. PC, PE, PG, PA, RI and related lysoforms are included in the sunflower lecithin composition. The most common saturated fatty acid inherent in animals,

Table 3. **Identifying the components of sunflower lecithin**

Phospholipid	Molar ion	Remains of fatty acids
PI	833	16:0, 18:2
	857	18:2, 18:2
	861	18:0, 18:2
LPI	595	18:2
	571	16:0
PA	695	18:2,18:2
	671	16:0, 18:2
	699	18:0, 18:2
PE	738	16:0, 18:2
PG	769	16:0, 18:2
	721	16:0, 16:0
	745	16:0, 18:2
LPG	483	16:0
PC	782	18:2,18:2
	758	16:0, 18:2
LPC	520	18:2
	496	16:0

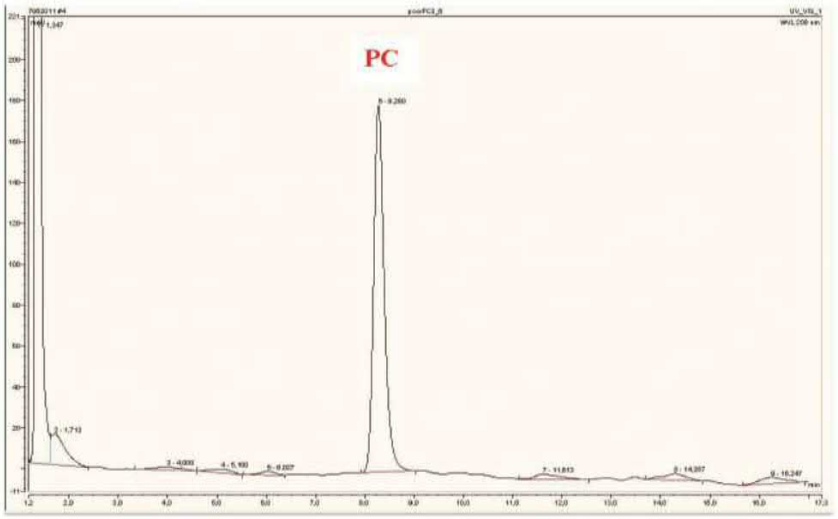


Fig. 4. **Chromatogram for PC extracted from sunflower lecithin by column chromatography based on main aluminum oxide**

Conditions of chromatography: v = 1 ml / min, t = 20 °C, λ = 208 nm column: Ultra ll Silica, 3 micron, 100×4.6 mm mobile phase: isocratic mode, A:B = 99:1; A — CH_3CN:CH_3OH:H_3RO_4 = 490:5:5 (vol.%), B — H_2O. PC Retention time span — 9.480 min

plants and microorganisms is palmitic acid (16:0). Stearic acid (18:0) is one of the essential fatty acids inherent in animals and some fungi and is a minor component of most plants. Oleic acid (18:1 omega-9) is the most common of monoene fatty acids in plants and animals. Palmitooleic acid (16:1 omega-7) is also widely occurred in animals, plants and microorganisms and is a major component of some vegetable oils. Linoleic acid (18:2

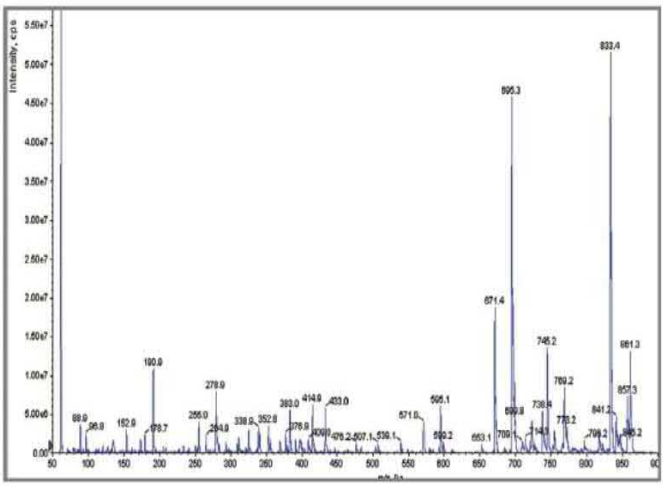


Fig. 5. **Sunflower lecithin ions spectrum ranging from 50 to 1000 a.m.u/ charge. Negative ionization**

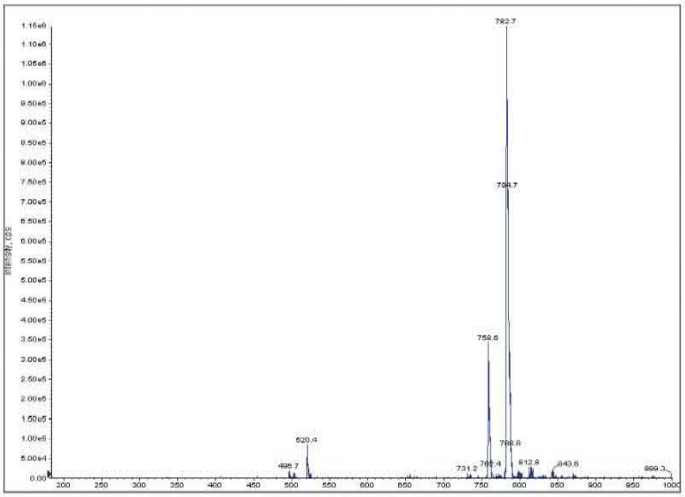


Fig. 6. **Sunflower lecithin ions spectrum ranging from 50 to 1000 a.m.u/ charge. Positive ionization.**

omega-6) is one of the essential fatty acids in plant lipids [13]. Palmitic and linoleic fatty acids are differently recombined in molecular composition of sunflower phospholipids. One of the most promising methods to deal with biotechnology implementation of phospholipids properties is creating the nanometer range structures — liposomes, synthetic analogs of biological membranes and their loading with drugs. Multiple functionalities of liposomes enable their successful inclusion in the scheme of medical treatment in the clinic [14]. The research of stability of liposomes (lipid peroxidation) obtained from sunflower lecithin was performed in the paper [7] as compared with liposomes, obtained from soybeans and egg yolks lecithin. The research results showed that liposomes obtained from sunflower lecithin proved to be the most stable.

The assumption was made in a number of studies that the stability of the liposomes could be linked to the phospholipid composition and different content pieces of unsaturated fatty acids, including oleic acid, which determine susceptibility to oxidation [8, 9]. However, the inspection results concerning the amount of fatty acids (in the form of ethyl ester derivatives)

using gas chromatography, showed that the content of unsaturated fatty acids of sunflower and soybeans lecithin, which were used in the experiments, were virtually the same (80% and 79%, respectively). In case of egg yolk lecithin, the total amount of unsaturated fatty acids reached 50%, with regard to the amount of oleic acid being about 5 times higher as compared to other lecithins. This is in compliance with the results concerning the properties of sunflower and soybeans lecithin [8] and egg yolk lecithin [9]. The presence of antioxidants contained in the extracts using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH Test) was also studied [15]. With regard to DPPH test system, the activity of free radicals was significantly less for sunflower lecithin than for soybean and egg yolk lecithin. Based on these results, the assumption was made that resistance of the liposomes obtained from sunflower lecithin to oxidative stress can be attributed to the effects of natural antioxidants. Research was conducted to identify α-tocopherol in sunflower lecithin samples according to GOST 30417-96. The content of α-tocopherol was discovered at 0.15% level, which is essential for maintaining stability of lyposomal substance.

The ability of α-tocopherol to dissolve only in fats and organic solvents hinders its entry to a cell. The decisive factor of α-tocopherol delivery into the cell through its membrane has to do with its inclusion in the bilayer of liposomes. Lipid bilayer typically contains PC, PE and α-tocopherol in a ratio of about 60:40:1. Phospholipids are favorable substrate for oxidation [17, 18], while they participate in a synergistic increasing in efficiency of tocopherol. Thus, prevention of membranes damage and decontamination of the process of free radical oxidation could be achieved through composition of phospholipids and polyphenols (α-tocopherol). The membrane-protective effect of α-tocopherol is associated with its participation in the membrane structure arrangement through direct interaction of its isodental side chain with polyunsaturated fatty acids as part of phospholipids. This interaction leads to denser packaging of mitochondrial membranes. As a result, their high resistance to lipid peroxygenation processes emerges due to the increased concentration of malondialdehyde and reduced activity level of antioxidant protection enzyme unit (superoxide dismutase and catalase).

REFERENCES

1. *Sulkowski W. W., Pentak D., Nowak K., Sulkowska A.* The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *J. Mol. Struct*. 2005, V. 744, P. 737–747.
2. *Yadav A. V., Murthy M. S., Shete A. S., Sfurti S.* Stability Aspects of Liposomes. *Ind. J. Pharm. Edu. Res*. 2011, 45 (4), 402–413.
3. *Liposome Drug Products.* Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. *Guidance for Industry*. U. S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER. October 2015. Pharmaceutical Quality/CMC Revision 1.
4. *Rasti B., Jinap S., Mozafari M. R., Yazid A. M.* Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food. Chem*. 2012, V. 135, P. 2761–2770.
5. *Araseki M., Yamamoto K., Miyashita K.* Oxidative Stability of Polyunsaturated Fatty Acid in Phosphatidylcholine Liposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2002, 66 (12), 2573–2577.
6. *Chen Irene A., Szostak Jack W.* Membrane growth can generate a transmembrane pH gradient in fatty acid vesicles. *PNAS*. 2004, 101 (21), 7965–7970.
7. *Shulga S. M., Glukh A. I., Glukh I. S.* Development of technology for obtaining dry lecithin from sunflower phosphatide concentrate. *Sci Innov*. 2012, V. 8, P. 62–71. (In Russian).
8. *Hollo J., Peredi J., Ruzics A. et al.* Sunflower lecithin and possibilities for utilization. *JAOCS*. 1993, V. 70, P. 997–1001.
9. *Budai L., Kaszas N., Grof P.* Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. *Sci Pharm*. 2013, V. 81, P. 1151–1166.
10. *WHO/CDS/NTD/IDM/*2007.4. Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis, Rome, Italy, 16 April 2005: World Health Organization, 18 p.
11. *Henschen A. K-P. Hupe, Lottspeich F., Voelter W.* High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry. Edited by A. Henschen K-P. Hupe. *Verlag Chemie, Weinheim*. 1986. P. xiii + 638.
12. *Shulga S. M., Glukh I. S.* Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions from sunflower. *Abstracts of posters 10th ILPS Phospholipid Congress*, Rotterdam, the Netherlands, 16–18 September 2011, P. 6.
13. *Rustan A. C., Drevon C. A.* Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of life sci.*, John Wiley & Sons. 2005, P. 1–7. doi: 10.1038/npg.els.0003894.
14. *Raynor A., Jantscheff P., Ross T., Schlesinger M., Wilde M., Haasis S., Dreckmann T., Bendas G., Massing U.* Saturated and mono-

unsaturated lysophosphatidylcholine metabolism in tumour cells: a potential therapeutic target for preventing metastases. *Lipids in Health and Disease*. 2015, 14 (69), 1–15. doi: 10.1186/s12944-015-0070-x.
15. *MelnykAndrii K., SukhoveevOlexandr V., Kononets Lyudmyla A., Khilchevsky Olexandr M., Shulga Serhiy M., Kukhar Valery P., and Vovk Andriy I.* An EPR spin probe study of liposomes from sunflower and soybean phospholipids. *J. Liposome Res.* 2015, Early Online: 1–7, Informa Healthcare USA, Inc. doi: 10.3109/08982104.2015.1039031.
16. *Roselena S. Schuh, Fernanda Bruxel, Helder F. Teixeira.* Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. *Quim. Nova.* 2014, 37 (7), 1193–1198.
17. *Schnitzer E., Pinchuk I., Lichtenberg D.* Peroxidation of liposomal lipids. *Eur. Biophys. J.*, 2007, V. 36, P. 499–515.
18. *Reis A., Spickett C. M.* Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012, V. 1818, P. 2374–2387.

ЗАЛЕЖНІСТЬ СТАБІЛЬНОСТІ ЛІПОСОМ ВІД ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ЛЕЦИТИНУ І ФОСФОЛІПІДІВ СОНЯШНИКУ

С. М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Метою роботи було визначення стабільності ліпосом залежно від жирнокислотного складу лецитину та есенціальних фосфоліпідів соняшнику. Методом високоефективної рідинної хроматографії визначено умови розділення фосфоліпідів соняшнику і розроблено методику кількісного виявлення фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну і фосфатидилінозитолу в нормальнофазному режимі за зовнішніми стандартами та порядком їх виходу. Ідентифіковано фосфоліпідний склад лецитину соняшнику та визначено жирнокислотний склад фосфоліпідів за допомогою методу тандемної мас-спектрометрії. Встановлено наявність у складі ліпосом антиоксиданту α-токоферолу, що є умовою збереження їхньої стабільності. Мембранопротекторний ефект α-токоферолу пов'язаний з його участю в організації структури мембран через пряму взаємодію його бічного ізодентального ланцюга з поліненасиченими жирними кислотами фосфоліпідів, що сприяє більш щільному пакуванню мембран мітохондрій і підвищеній стійкості до процесів пероксидного окиснення ліпідів.

Ключові слова: лецитин, фосфоліпіди соняшнику, жирні кислоти, ліпосоми.

ЗАВИСИМОСТЬ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИПОСОМ ОТ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛЕЦИТИНА И ФОСФОЛИПИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Целью работы было определение стабильности липосом в зависимости от жирнокислотного состава лецитина и эссенциальных фосфолипидов подсолнечника. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определены условия разделения фосфолипидов подсолнечника и разработана методика количественного выявления фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола в нормальнофазном режиме в соответствии с внешними стандартами и порядком их выхода. Идентифицирован фосфолипидный состав лецитина подсолнечника и определен жирнокислотный состав фосфолипидов с помощью метода тандемной масс-спектрометрии. Установлено наличие в составе липосом антиоксиданта α-токоферола, что является условием сохранения их стабильности. Мембранопротекторный эффект α-токоферола связан с его участием в организации структуры мембран за счет прямого взаимодействия его боковой изодентальной цепи с полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов, что способствует более плотной упаковке мембран митохондрий и появлению повышенной устойчивости к действию процессов пероксидного окисления липидов.

Ключевые слова: лецитин, фосфолипиды подсолнечника, жирные кислоты, липосомы.

Journal of Liposome Research

http://informahealthcare.com/lpr
ISSN: 0898-2104 (print), 1532-2394 (electronic)

J Liposome Res, 2016; 26(1): 80–86
© 2015 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/08982104.2015.1039031

informa healthcare

RESEARCH ARTICLE

An EPR spin probe study of liposomes from sunflower and soybean phospholipids

Andrii K. Melnyk[1,2], Olexandr V. Sukhoveev[1], Lyudmyla A. Kononets[1], Olexandr M. Khilchevsky[1], Serhiy M. Shulga[3], Valery P. Kukhar[1], and Andriy I. Vovk[1]

[1]Department of Bioorganic Mechanisms, Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, [2]Department of Sorption and Fine Inorganic Synthesis, Institute for Sorption and Problems of Endoecology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine and [3]Department of Industrial and Food Biotechnology, Institute for Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Abstract

Comparative properties of lecithin-based liposomes prepared from the mixed phospholipids of sunflower seeds, soybean and egg yolk were investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. For these investigations, stable nitroxide radicals, 1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl 5,7-dimethyladamantane-1-carboxylate (DMAC-TEMPO), 5-doxylstearic acid (5-DSA) and 16-doxylstearic acid (16-DSA) were used as spin probes. Binding of the spin probes to the liposome membranes resulted in a substantial increase of the apparent rotational diffusion correlation times. The EPR spectra of the incorporated nitroxides underwent temperature-dependent changes. For every spin probe, values of apparent enthalpy and entropy of activation were calculated from the temperature dependence of rotational diffusion correlation times *via* Arrhenius equation. In case of DMAC-TEMPO, the data point to differences between the phospholipid bilayer of liposomes derived from sunflower and soy lecithin, and some similarity between the sunflower and egg yolk liposomes. Anisotropic hyperfine interaction constants of DMAC-TEMPO and 16-DSA included in the liposomes have been analyzed and attributed to different micropolarity of the surroundings of the spin probes. The kinetics of EPR signal decay of DMAC-TEMPO in the presence of 2,2′-azobis(2-amidinopropane) suggest the better stability of the sunflower liposomes to lipid peroxidation as compared to the liposomes prepared from soy lecithin.

Keywords

EPR, lipid peroxidation, liposomes, spin probe, sunflower and soybean phospholipids

History

Received 27 March 2015
Accepted 6 April 2015
Published online 6 May 2015

Introduction

Liposomes are highly versatile structures used in scientific researches with potential application in food, pharmaceutical, medical and cosmetic industries. They are widely studied as models for biological membranes and as potential drug delivery carriers (Barenholz, 2001; Goyal et al., 2005; Malam et al., 2009; Mozafari et al., 2008). In order to assess the quality of liposomes, various parameters should be monitored. The main characteristics include the chemical composition, average diameter, as well as degree of size polydispersity, encapsulation efficiency, the ratio of phospholipids to encapsulant concentration and lamellarity. Chemical composition of the liposomal phospholipids determines their physical and chemical properties, including stability (Yadav et al., 2011). It is known that peroxidation of liposomes produces hydro- and cyclic peroxides, aldehydes, keto acids and other compounds. This process leads to the increasing fluidity of membrane structure and facilitates its disintegration. As a result, the ease of peroxidation determines instability of the liposomes (Rasti et al., 2012; Schnitzer et al., 2007).

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is one of the most informative methods to study fluidity and restructuring in the lipid bilayer (Cimato et al., 2004; Hager et al., 1993). This spectroscopic technique can detect changes in the spectral parameters of synthetic spin probes, usually stable nitroxide radicals. Analysis of EPR spectra of these radicals allows to characterize the properties of the spin probe environment. The values of rotational diffusion correlation time and hyperfine interaction constants are the major parameters obtained from the analysis of the EPR spectra, and they can provide valuable information about structural properties of natural and model membranes. Presence of two or more spectral components with different parameters may give additional information about the processes occurring in this region. The EPR method has been used to study the influence of temperature and pH on stability of liposomes

Address for correspondence: Serhiy M. Shulga, Department of Industrial and Food Biotechnology, Institute for Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. E-mail: shulga5@i.ua

DOI: 10.3109/08982104.2015.1039031

(Sulkowski et al., 2005). It can be used to investigate the oxidation resistancy of liposomes (Cimato et al., 2004), the depth of spin probe penetration into the lipid bilayer (Gamliel et al., 2008) and biophysical properties of liposomes containing oxidatively modified phospholipids (Jurkiewicz et al., 2012).

Recently, considerable attention has been given to developing liposomal products from different sources including deoil sunflower lecithin. Administration of liposomes, which are based on natural raw lecithin (the mix phospholipids) or pure phosphatidylcholine, does not carry the risk of toxic effects and allergic reactions. In addition, there are no restrictions on the use of natural lecithin in food products, cosmetics and medicines in the European Union and in the US Food and Drug Administration management guidelines for quality control of food, medicines and cosmetics.

The aim of this work was to compare the EPR characteristics of spin probes incorporated into liposomes prepared from sunflower and soy phospholipids as well as egg yolk phospholipids. In addition, an important objective was to compare the stability of spin probe during peroxidation of sunflower and soy liposomes.

Materials and methods

Materials

The nitroxide radical, 1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-4-yl 5,7-dimethyladamantane-1-carboxylate (DMAC-TEMPO), was synthesized by reaction of 5,7-dimethyladamantane-1-carbonyl cloride with 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl according to a similar procedure described previously (Vovk et al., 2004). The purity of DMAC-TEMPO was confirmed by using HPLC with MS detection and by ^{1}H NMR analysis. Prior to the analysis, the nitroxyl group was reduced to the corresponding hydroxylamine in reaction with phenylhydrazine. 5-Doxylstearic acid (5-DSA) and 16-doxylstearic acid (16-DSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Egg yolk lecithin (Sigma-Aldrich) and deoil dry lecithin extracted from sunflower seeds and soybean (JSC DOIREA, Dnepropetrovsk, Ukraine) (Shulga et al., 2012) were used for liposome preparation. 2,2′-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP) (Sigma-Aldrich) was used as an initiator of lipid peroxidation.

Preparation of liposomes

The liposomes were prepared by sonication method (Murakami et al., 2000). Sonication produces mixtures of unilamellar and multilamellar vesicles of just greater than 100 nm in size. Disruption of large multilamellar vesicles suspensions using sonication typically produces small, unilamellar vesicles with diameters in the range of 30–70 nm. The nitroxide radicals were added to the solution of lecithin (16 mg/ml) in distilled chloroform. After evaporation of the solvent, the resulting lipid film was dispersed in 5 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.4), which was described as having a protective effect against lipid peroxidation (Fiorentini et al., 1989). To produce unilamellar liposomes, sonification was performed with the use of ultrasonic dispercer for the duration of 15 min, with the ultrasound frequency set to 22 kHz. Separation of multilamellar vesicles was performed by centrifugation at 2000*g* for 4 min. Final spin probe concentration was 2 mM.

The size of the liposomes was determined by using laser photon correlation spectrometer Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) and atomic force microscope (AFM) SOLVER PRO M (NT MDT). The diffusion coefficient of the particles dispersed in the liquid was determined by the analysis of characteristic fluctuations of scattered light intensity. Registration and statistical processing of laser light scattered from an aqueous suspension liposomal form were carried out at the temperature of 25 °C and at the dispersion angle of 173 °. The measurement time is determined by the device automatically. One act of measurement lasts 10 s, the total time of one measurement (10–15 acts) 1.5–2 min. The measurement was repeated four times to control the stability. The results of the size distribution in terms of intensity and quantitative measurements were obtained from the analysis of the correlation function using the general-purpose algorithm implemented in Zetasizer Software 6.20.

AFM measurements in the aqueous solution were performed using a SOLVER PRO M after dropping a liposome suspension on a silanized substrate. Silicon chip with a size of 20 mm^2, cut from silicon wafer, was to use as a substrate for the AFM measurement of liposome. Scanning area was 2 μm^2 and scan rate was around 1.0 Hz. Set point, the force between tip and sample, was carefully controlled in order not to destroy vesicular structure.

EPR experiments

EPR spectra were recorded on X-band spectrometer Bruker Elexsys E580 X-band (9 GHz). Capillaries with an internal diameter of 0.8 mm were filled with the prepared solution of liposomes containing the spin probe and then inserted into standard quartz ampoules Norrell S EPR 250S. Samples of Mn^{2+}/MgO (third and fourth spectral lines) and DPPH ($g = 2.0036$) were used for the spectrometer calibration. Parameters of the experiment were as follows: frequency and microwave power – 9.863 GHz and 1 mW (linear region of the saturation curve) correspondingly, modulation frequency – 100 kHz, modulation amplitude – 1 G, scan range – 100 G, time constant – 81 ms, sweep time – 90 s, number of scans – four. Temperature was 295 ± 0.5 K while recording the single spectrum. Thermostating was performed by the variable temperature unit BVT3000. Every temperature value was set for at least 3 min. The stability of measurements was ±0.3 K.

Kinetic EPR studies were performed on X-band EPR spectrometer Varian E-3. The parameters of the experiment were: microwave frequency and power – 9.11 GHz and 0.63 mW, modulation frequency – 100 kHz, modulation amplitude – 2 G; scan range – 50 G with the central magnetic field value of 3205 G, time constant – 1 s, scan time – 4 min.

Results and discussion

When particle size was measured shortly after liposome preparation, there was consistently only one major peak of relatively uniform size in the range of 70–90 nm. Over time however, minor peaks of larger size were developed. Vesicles sizes analysis showed that the sizes were 71.37 ± 4.33,

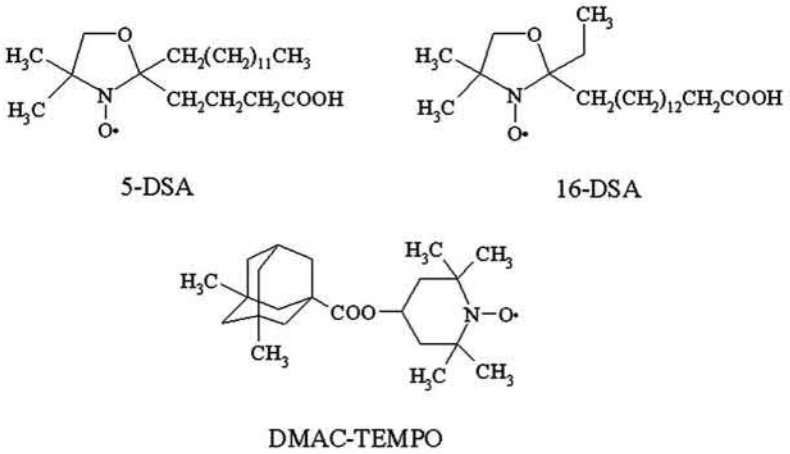


Figure 1. Chemical structure of 5-DSA, 16-DSA and DMAC-TEMPO used as spin probes.

66.13 ± 3.80 and 68.58 ± 3.63 nm for the liposomes prepared from sunflower, soy lecithin and egg yolk, respectively. The polydispersity index (PDI) of the investigated vesicles showed values from 0.247 ± 0.028 to 0.279 ± 0.039, indicating homogenous populations (PDI < 0.3) of vesicles. After sizing of liposomes using Zetasizer, all samples were freeze-dried and placed into refrigerator for one month at temperature of 6 °C. After this period, the sizing of liposomes was repeated once again by using the atomic force microscope. The size of the liposomes after storage was changed but not noticeably (76.46 ± 4.19, 72.32 ± 3.60 and 74.42 ± 4.56 nm for the liposomes prepared from sunflower and soy lecithin, and egg yolk, respectively) that indicates their stability. Data are mean ± standard deviation (S.D.) from three independently performed experiments. Statistical analysis was carried out using the One-way ANOVA (SPSS 11.5 software). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Three paramagnetic compounds, DMAD-TEMPO, 5-DSA and 16-DSA, were employed to analyze the properties of lecithin-based liposomes from sunflower seeds and soybean (Figure 1). Stable adamantane-based radical DMAC-TEMPO was supposed to bind to liposomes, since the structurally similar adamantane derivative, 1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl adamantane-1-acetate was effectively used in the study of thylakoid chloroplast membranes to determinate their heterogeneity (Kochubey et al., 2007). Another compounds, 5-DSA and 16-DSA, are well-known spin probes in the investigations of model and natural membrane structures. These stable radicals having high lipophilicity can be used to characterize the properties of different regions of phospholipids in liposomes.

EPR spectrum of DMAC-TEMPO incorporated into liposomes during their preparation is shown in Figure 2(A). The high-field line of the spectrum consists of two components that correspond to the distribution of the spin probe between the local phospholipid environment (broadened line due to the slow rotational mobility) and aqueous environment (fast rotational diffusion of the radical). Figure 2(C) represents the spectrum of DMAC-TEMPO recorded in water. A standard double integration feature of the Xepr program was used for quantitative analysis of the spectra. In order to separate the components of the superimposed spectrum, which depend on the distribution of the spin probe between the lipid and aqueous phases, potassium ferricyanide was added to the liposome suspension to suppress the EPR signal of the radical in water. In this case, the signal of the spin probe localized in phospholipid environment of the liposomes remained unchanged (Figure 2B). Our experiments showed that almost complete immersion of the stable radicals into the lipid layer (90–95% of the total concentration of the probe) of fresh liposomes from lecithin of any origin (less than three hours since preparation) was observed.

The effective rotational diffusion correlation times for the spin probes DMAC-TEMPO and 16-DSA were calculated according to the following formula (Kievelson, 1960)

$$t_{\text{eff}} = 6.5 \times 10^{-10} DW_0 \{(H_0/H_{-1})^{1/2} + (H_0/H_1)^{1/2} - 2\}$$

where ΔW_0 is the peak-to-peak linewidth of the central line, H_0, H_{-1} and H_1 are the intensities of the central, high-field and low-field lines, respectively. This formula gives a fairly good approximation to anisotropic rotation of radicals in a wide range of correlation time values corresponding to the area of partly reduced probe mobility. EPR spectra of 5-DSA, incorporated into liposomes, indicate so-called slow motion of the spin probe in the liposome membrane. For this compound, the rotation correlation times were calculated according to the model of Brownian rotational diffusion using the semi-empiric equation (Freed, 1976)

$$t_{\text{eff}} = 5.4 \times 10^{-10} \left(1 - A'_{zz}/A_{zz}\right)^{-1.36}$$

where A'_{zz} is the parallel hyperfine splitting between the low and high field spectral components of the spectra in 5–60 °C temperature range, and A_{zz} is the same parameter from the spectrum recorded at 77 K.

Experiments with DMAD-TEMPO were carried out in the temperature range of 275–325 K, and those with 16-DSA in the range of 280–332.5 K. Figure 3 demonstrates typical EPR spectra of DMAD-TEMPO, 5-DSA and 16-DSA immobilized in sunflower liposomes and measured at two temperatures.

DOI: 10.3109/08982104.2015.1039031

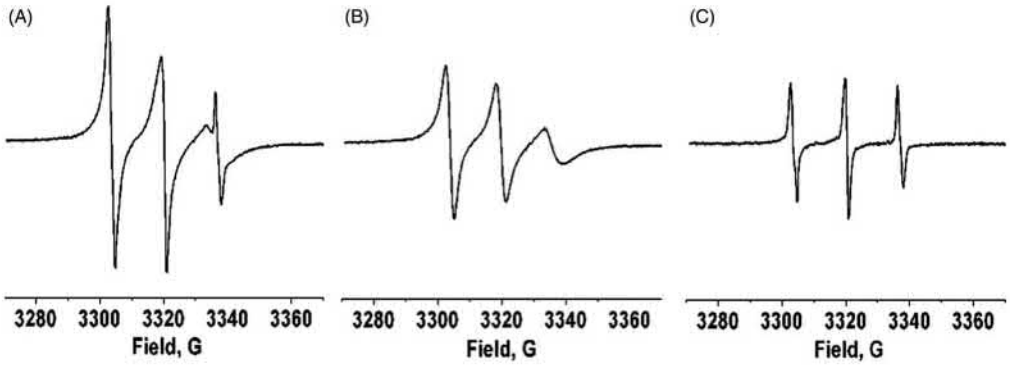


Figure 2. Two-component spectrum of DMAC-TEMPO (A) representing a superposition of the spectra of the spin probe in liposome (B) and in aqueous (C) environments ($T = 280$ K).

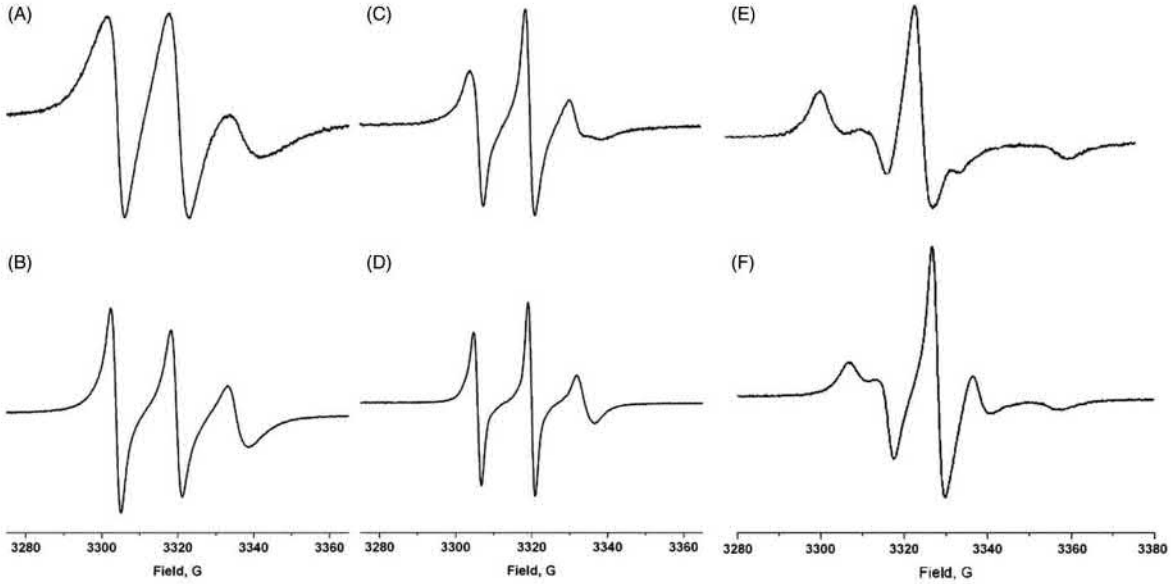


Figure 3. Representative EPR spectra of nitroxide radicals DMAC-TEMPO (A, B) 5-DSA (C, D) and 16-DSA (E, F) immobilized in sunflower liposomes. $T = 285$ K (A, C), 325 K (B, D), 278 K (E), 318 K (F).

The calculated values τ_{eff} are ranged approximately from 1 to 6 ns for DMAD-TEMPO and from 1 to 3 ns for 16-DSA being related to the border of fast and slow motion of the spin probes. The calculated values of correlation times for 5-DSA in all types of liposomes are within the range from 3 to 15 ns. It was found that the values of τ_{eff} are the greatest throughout the whole temperature range for liposomes prepared from sunflower lecithin. This indicates larger rigidity of the environment of the spin probes in the liposomes from sunflower lecithin as compared to liposomal structures obtained from soy lecithin.

Arrhenius plots of the rotational diffusion correlation times (Figure 4) were built based on the formula

$$\frac{1}{\tau_{\text{eff}}} = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^{\#}}{R}\right) \exp\left(\frac{-\Delta H^{\#}}{RT}\right)$$

Thermodynamic characteristics of the rotational diffusion for all the spin probes are presented in Table 1. The apparent entropy and enthalpy of activation reflect the microstate of the system in the spin probe localization area (Sulkowski et al., 2005) and approximately coincide with those for nitroxides immobilized in the densely packed layers of protein matrix as well as soft and rigid polimer systems (Lichtenstein, 1976; Lozinsky et al., 2002). The value of rotational diffusion enthalpy can be determined by the energy required for dissociation of the spin probe from its matrix and by the temperature-dependent flexibility changes of the local environment. By using DMAC-TEMPO, the value of apparent enthalpy of activation is higher for liposomes from sunflower seeds (22.46 kJ/mol) as compared to that for liposomes derived from soybean (18.52 kJ/mol); and the corresponding value for liposomes derived from egg yolk is 21.45 kJ/mol. On the contrary, the values of the apparent enthalpy of

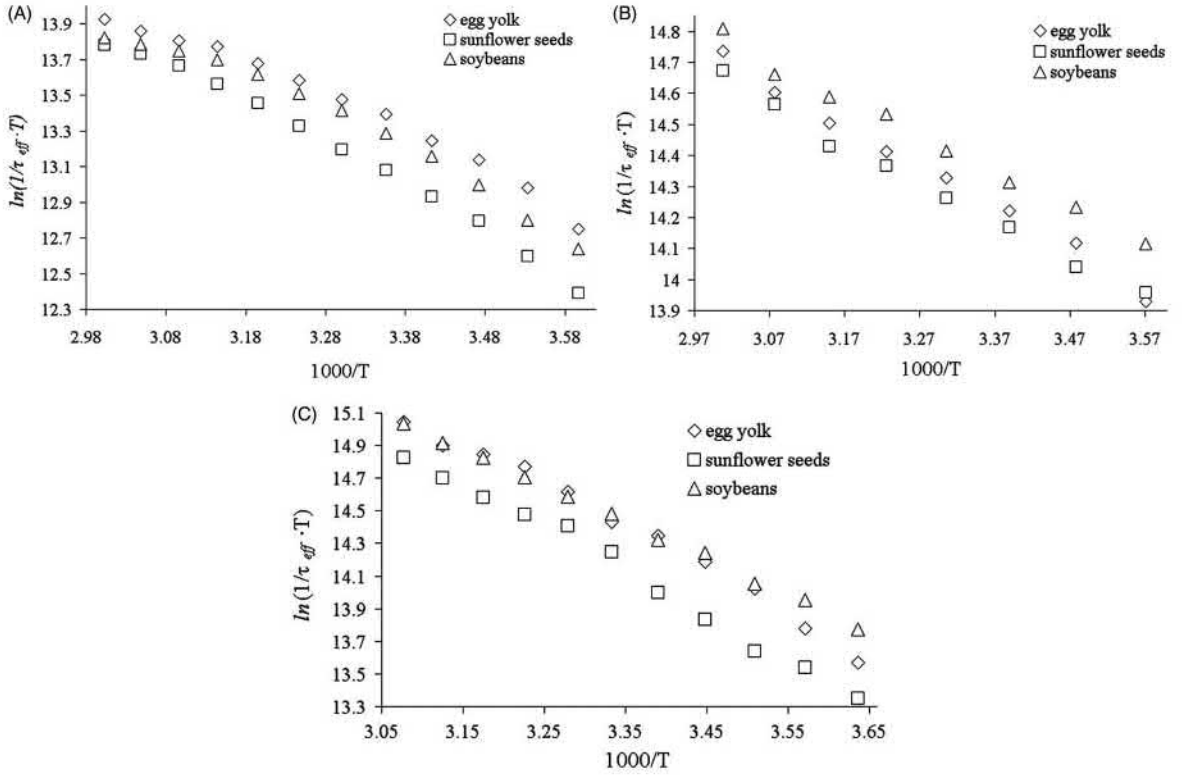


Figure 4. Arrhenius plots of the rotational diffusion correlation time for 5-DSA (A), 16-DSA (B) and DMAC-TEMPO (C) incorporated into liposomes from sunflower seeds, soy and egg yolk. In case of 5-DSA, the activation parameters $\Delta H^{\#}_{app}$ and $\Delta S^{\#}_{app}$ were calculated from the temperature region from 278 to 313 K.

Table 1. Apparent activation parameters for rotational diffusion of spin probes DMAC-TEMPO, 5-DSA and 16-DSA in liposomes of different origin.[a]

Spin probe	Liposomes	$\Delta H^{\#}_{app}$ (kJ mol^{-1})	$\Delta S^{\#}_{app}$ (e.u.)
DMAC-TEMPO	Egg yolk	21.45 ± 0.82	-1.44 ± 0.02
	Sunflower	22.46 ± 0.69	-1.16 ± 0.01
	Soy	18.52 ± 0.26	-3.72 ± 0.02
5-DSA	Egg yolk	18.46 ± 0.91	-5.87 ± 0.10
	Sunflower	21.46 ± 0.64	-4.06 ± 0.05
	Soy	20.31 ± 0.73	-4.58 ± 0.06
16-DSA	Egg yolk	11.08 ± 0.40	-10.02 ± 0.08
	Sunflower	10.47 ± 0.36	-10.59 ± 0.08
	Soy	9.75 ± 0.37	-10.85 ± 0.09

Values of $\Delta H^{\#}_{app}$ and $\Delta S^{\#}_{app}$ are presented as means ± SE.
[a]Values of r^2 were 0.985–0.998 for all the lines of the Arrhenius plots.

activations are quite similar for 5-DSA in both soybean and sunflower liposomes. In case of 16-DSA, the apparent values of $\Delta H^{\#}$ showed less differences in the environment of the spin probes in liposomes from different sources. The location of spin fragments of DMAC-TEMPO and 5-DSA at the head group region of the phospholipids were accompanied by increase of entropy values as compared to 16-DSA.

Figure 5 shows temperature dependence of nitrogen hyperfine interaction constants calculated from the spectra of DMAC-TEMPO and 16-DSA for the various liposomal structures. The EPR spectra showed that a_N values are consistently smaller for 16-DSA as a result of localization of the paramagnetic part of the spin probe near the hydrocarbon chains of the phospholipids. In contrast to that, DMAC-TEMPO is possibly situated at the head-group region of the liposomes. At temperature range of 275–325 K, the temperature dependence for DMAC-TEMPO in liposomes from sunflower lecithin and egg yolk is more linear than that for the soybeans source (r^2 are 0.98, 0.98 and 0.93, respectively). This may indicate their greater uniformity and resistance to the changes in temperature. The deviations from linearity in the case of liposomes from soybean (Figure 5A) may be related to diffuse phase transition (Alonso et al., 2003; Anjoset al., 2011). The decrease in the hyperfine coupling constants of DMAC-TEMPO for all types of liposomes with increasing temperature indicates the increase in the non-polar character of the environment around the nitroxide moiety of the spin probe. Considering the possibility of water penetration in membrane structures (Alves & Peric, 2006; Griffith et al., 1974), this may be explained by the relatively decreasing the concentration of water molecules due to their diffusion out of the hydrophobic area, or by deeper immersion of the spin probe into the liposome. The other character of temperature dependence of hyperfine coupling constants for 16-DSA (Figure 5B) may also indicate the influence of effective water concentration, due to thermal motion.

In order to evaluate the stability of liposomes by means of a spin probe, kinetics of EPR signal decay of DMAC-TEMPO

DOI: 10.3109/08982104.2015.1039031

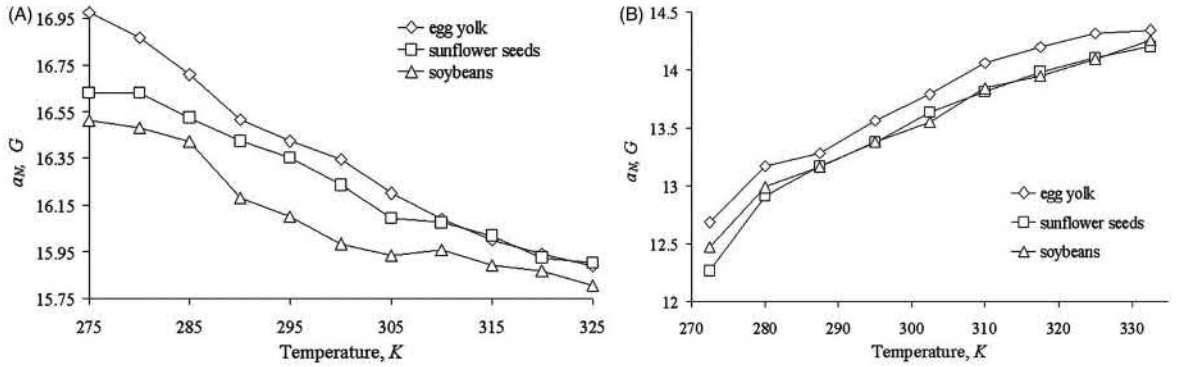


Figure 5. Temperature dependence of nitrogen hyperfine interaction constants for DMAC-TEMPO (A) and 16-DSA (B) incorporated into liposomes from sunflower, soy and egg yolk.

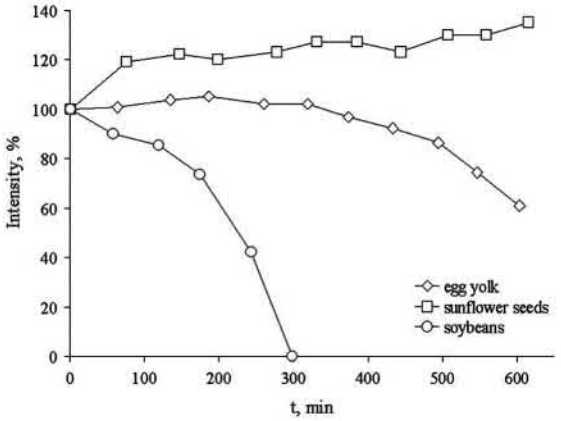


Figure 6. Kinetics of EPR signal decay of DMAC-TEMPO in the presence of ABAP. Liposomes: 1 – from egg yolk, 2 – from sunflower, 3 – from soy.

in the presence of ABAP have been studied. In such systems, the consumption of spin probe in reaction with free radicals initiated by azo compound can correlate with accumulation of lipid hydroperoxides (Cimato et al., 2004). Before the recording, samples of liposomes were maintained at the temperature of 25 °C. The EPR signal intensity decay during the incubation time was measured in a system containing suspension of liposomes and ABAP at 45 °C. The azo initiator was added immediately before measurements (final concentration of 20 mM). The first spectrum was recorded after 15 min from the beginning of the reaction, and further spectra were recorded at intervals of 60 min. The kinetic study showed that the least stable liposomes are those derived from soybean (Figure 6). Their EPR signal decreases over time that can be attributed to the interaction of nitroxide radical with free radicals formed in the lipid peroxidation process. The liposomes derived from sunflower seeds are the most resistant, because the intensity of their EPR signal is not reduced for the duration of experiment. The signal intensity for liposomes obtained from egg yolk starts to drop after 5 h. In the absence of ABAP, the shape of EPR spectra and the signal intensity remained practically unchanged over eight hours indicating the stability of liposomal structures. It is interesting that the EPR spectra recorded after preliminary storage of liposomes at 280 K for eight days were characterized by different distribution of the stable radical between lipid and aqueous environment. The spin probe location in aqueous environment was increased for liposomes derived from soybean phospholipids (approximately 15% of the total intensity) as compared to liposomes obtained from sunflower seeds (approximately 5%). These data suggest the better stability of the sunflower liposomes to lipid peroxidation as compared to the liposomes prepared from soybean.

The results obtained could be attributed to the different phospholipid composition and the different content of the unsaturated fatty acid fragments which may determine the oxidation sensitivity of lecithins (Lee et al., 1998; Reis & Spickett, 2012). However, the data of checking the fatty acid amount (in form of the ethyl ester derivatives) by gas–liquid chromatography showed that content of the unsaturated fatty acid chains of the sunflower and soybean lecithins, which were used in the experiments, seems to be similar (80% and 79%, respectively). In case of the egg yolk lecithin the unsaturated fatty acid contribution sum up to 50%, with amount of oleic acid being about 5-fold higher than in other types of lecithin. This is in accordance with known similarities in the properties of the sunflower and soybean lecithins (Hollo et al., 1993). At the same time, egg yolk lecithin contains less unsaturated lipid than the soybean one (Budai et al., 2013). We have also analyzed the presence of antioxidants in ethanol extract of the phospholipid batches, using bleaching of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH test). In the DPPH test system, free radical-scavenging activity was evaluated to be considerably higher for sunflower lecithin than for soy and egg yolk lecithins. Thus, the stability of the sunflower lecithin against oxidative modification may be attributed to the effects of the natural antioxidants.

Conclusions

The results of the EPR spin probe study revealed different properties of liposomes obtained from sunflower and soy lecithin, and some similarities between the sunflower and egg yolk liposomes were detected. Analysis of hyperfine

interaction constants and rotational diffusion correlation times from EPR spectra of DMAC-TEMPO immobilized in the liposomal structures showed a difference in the environment surrounding of the spin probe in proximity of the polar shell of the membrane structures. The present study also revealed that liposomes derived from sunflower lecithin are the most resistant to peroxidation.

Declaration of interest

This study was financially supported by State Fund of Fundamental Research of Ukraine (Projects 3/03-2013, F52.2.).

References

Alonso A, Silva JV, Tabak M. (2003). Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1646:32–41.

Alves M, Peric M. (2006). An EPR study of the interfacial properties of phosphatidylcholine vesicles with different lipid chain lengths. Biophys Chem 122:66–73.

Anjos J LV, Santiagob PS, Tabak M, Alonso A. (2011). On the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants: temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility. Colloids Surf B 88: 463–70.

Barenholz Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. Curr Opin Colloid Interface Sci 6:66–77.

Budai L, Kaszas N, Grof P, et al. (2013). Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. Sci Pharm 81:1151–66.

Cimato AN, Piehl LL, Facorro GB, et al. (2004). Antioxidant effects of water- and lipid-soluble nitroxide radicals in liposomes. Free Rad Biol Med 37:2042–51.

Gamliel A, Afri M, Frimer AA. (2008). Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps. Free Rad Biol Med 44: 1394–405.

Goyal P, Goyal K, Kumar SGV, et al. (2005). Liposomal drug delivery systems – clinical applications. Acta Pharm 55:1–25.

Griffith OH, Dehlinger PJ, Van SP. (1974). Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (evidence for water penetration in biological membranes). J Membr Biol 15:159–92.

Fiorentini D, Landi L, Barzanti V, Cabrini L. (1989). Buffers can modulate the effect of sonication on egg lecithin liposomes. Free Rad Res 6:243–50.

Freed JH. (1976). Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides. In: Berliner LJ, ed. Spin labelling. Theory and applications. New York (NY): Academic Press, 64–155.

Hager AA, Paoli TD, Ihlo JE, et al. (1993). Stability study of lecithin liposomes during storage using ESR. Spectrochim Acta Part A 49: 1999–2005.

Hollo J, Peredi J, Ruzics A, et al. (1993). Sunflower lecithin and possibilities for utilization. JAOCS 70:997–1001.

Jurkiewicz P, Olżyńska A, Cwiklik L, et al. (2012). Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. Biochim Biophys Acta 1818:2388–402.

Kievelson D. (1960). Theory of ESR linewidths of free radicals. J Chem Phys 33:1094–106.

Kochubey SM, Vovk AI, Bondarenko OYu, et al. (2007). Heterogeneity of thylakoid membranes studied by EPR spin probe. Biochemistry (Moscow) 72:558–64.

Lee C, Barnett J, Reaven PD. (1998). Liposomes enriched in oleic acid are less susceptible to oxidation and have less proinflammatory activity when exposed to oxidizing conditions. J Lipid Res 39: 1239–47.

Lichtenstein GI. (1976). Spin labelling methods in molecular biology. New York: Wiley Interscience.

Lozinsky E, Febbraio F, Shames AI, et al. (2002). Heterogeneity in the structural dynamics of Sulfolobus solfataricus β-glycosidase revealed by electron paramagnetic resonance and frequency domain fluorometry. Protein Sci 11:2535–44.

Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol Sci 30:592–9.

Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. J Liposome Res 18:309–27.

Murakami M, Fukatsu K, Ohkawa S, et al. (2000). ESR study on the antioxidant activity of TAK-218 in biological model membranes. Chem Pharm Bull 48:784–92.

Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. Food Chem 135:2761–70.

Reis A, Spickett CM. (2012) Chemistry of phospholipid oxidation. Biochim Biophys Acta 1818:2374–87.

Schnitzer E, Pinchuk I, Lichtenberg D. (2007). Peroxidation of liposomal lipids. Eur Biophys J 36:499–515.

Shulga SM, Glukh AI, Glukh IS, et al. (2012). Development of technology for obtaining dry lecithin from sunflower phosphatide concentrate. Sci Innov 8:62–71.

Sulkowski WW, Pentak D, Nowak K, Sulkowska A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. J Mol Struct 744:737–47.

Vovk AI, Kharchenko OV, Kharitonenko AI, et al. (2004). Hydrophobic nitroxyl radicals inhibit linoleyl alcohol oxidation by 5-lipoxygenase. Russ J Bioorg Chem 30:391–5.

Yadav AV, Murthy MS, Shete AS, Sfurti S. (2011). Stability aspects of liposomes. Ind J Pharm Edu Res 45:402–13.

Molecular Simulation, 2015
http://dx.doi.org/10.1080/08927022.2015.1020487

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

A coarse grained molecular dynamics study on the structure and stability of small-sized liposomes

Hideaki Tamai[a], Naoko Okutsu[a], Yuki Tokuyama[a], Eisuke Shimizu[a], Satoshi Miyagi[a], Sergiy Shulga[b], Victor I. Danilov[c] and Noriyuki Kurita[a]*

[a]*Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Japan;* [b]*Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;* [c]*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

(*Received 21 July 2014; final version received 6 February 2015*)

The dependence of geometric structure and thermal stability of liposomes on their component phospholipid molecules and distribution of molecules in the inner and the outer layers of the liposome is investigated by conducting molecular simulations in explicit water for the eight types of liposomes constructed from different phospholipids. Using molecular mechanics structure-relaxation based on the coarse grained (CG) model, stable structures of the solvated liposomes are obtained. In addition, the molecular dynamics (MD) simulations based on the CG model are carried out at 310 and 360 K for elucidating the change in structure of the solvated liposomes. The MD simulations reveal that liposomes having the same number of lipids (SNL) in both the inner and the outer layers keep their spherical structures even at 360 K. In particular, the SNLs composed of palmitoyloleoyl-phosphatidyl-ethanolamine1 or dimyristoylglycero-phosphatidyl-choline lipid exhibit a compact spherical shape. In contrast, liposomes having the same density of lipids in the inner and the outer layers cannot keep their spherical shapes at 360 K. The obtained results contribute toward developing novel liposomes with enhanced thermal stability.

Keywords: liposome; phospholipids; coarse grained model; molecular dynamics; stable structure

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

1. Introduction

Liposome is a self-assembly composed of phospholipid molecules with a spherical bilayer structure. Due to the presence of internal cavity typically filled by water, liposome can encapsulate various molecules into their interior, acting as a drug carrier in drug delivery systems. [1,2] Because liposome is composed of naturally occurring biological substances, its biocompatibility to human body makes it an efficacious drug carrier friendly to biological barriers. In addition, because the inner and the outer surfaces of liposome are filled with hydrophilic polar part of phospholipids, many kinds of functional molecules can be attached to the surface of liposome to alter its biophysical properties. It was reported [3] that a liposome with absorptive factors attached to the surface effectively scavenges specific substances. This technique can be used for removing radioactive elements out of the human body.

Many kinds of biophysical properties of lipid bilayer membranes and liposomes were investigated by molecular dynamics (MD) simulations. For example, the following properties were previously elucidated by using the coarse grained (CG) model.[4–6]

(1) Incorporation of a small amount of lysolipid into a flat lipid bilayer membrane stabilises the gel phase of the membrane.[4]
(2) Liposomes with thickness larger than a specific value prefer to have multi-layered structure.[5]
(3) A flat lipid bilayer membrane having 3522 phospholipid molecules spontaneously transforms to a liposome structure in 3 ns during MD simulation at 350 ± 5 K.[6]

Recently, a new hybrid model was developed for efficient modelling of complete vesicles at molecular detail.[7] In that model, Brownian dynamics and dynamical density functional theory were combined, in order to additionally reduce the computational cost of CG particle-based dissipative particle dynamics. In separate works,[8,9] MD simulations were used to study the spontaneous aggregation of a concentrated solution of dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) molecules in water in atomistic detail. The aggregation process was found to occur on a nanosecond time scale, with cuplike vesicles formed at intermediate stages.

Despite molecular modelling of lipid bilayers being an active research area, we are not aware of MD simulations of the structure and stability of liposomes in explicit solvent under periodic boundary conditions. Additional questions to answer are how the different phospholipid content affects stability of the liposome, and what molecular details of the liposome structure are. The answers will be sought in the present study.

*Corresponding author. Email: kurita@cs.tut.ac.jp

© 2015 Taylor & Francis

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

Here, we carry out CG-MD simulations in water for the eight types of liposomes composed of four different phospholipid molecules combined with two different layer arrangements, in order to elucidate which liposomes construction would be more stable. We first optimise the CG structures of the solvated liposomes by using molecular mechanics (MM) method. To elucidate the trend of stability among the liposomes, we conduct the CG–MD simulations at 310 and 360 K. The results obtained from these simulations highlight a remarkable dependence of the thermal stability of liposomes on their phospholipid content and composition.

2. Details of molecular simulations

This study is motivated by the need to improve the existing limited understanding of atomistic details of liposome structure. Such information is hard to directly obtain from the experiments. Computer simulations represent an ideal tool to address this shortcoming. From the basic geometric fact about liposome being a sphere, and from the intuitive understanding of the fact that the radius of the external surface is greater than the surface radius of the inner layer, one may conclude that a different number of phospholipid molecules would pack into the inner and the outer layers of the liposome. On the other hand, it is known that liposomes may spontaneously form from a lipid bilayer, [10] and that by bending the bilayer sheet into a sphere one may obtain different phospholipid density in the internal and external surfaces. Which one of these two possibilities would likely take place in the reality is hard to guess. Therefore the details of liposome structure need to be studied computationally. The first and the most obvious test would be to evaluate thermal stability of different structural formations of liposomes. Presumably the one having greater stability would be the preferred structure from the thermodynamic viewpoint.

In the present study, we employed four types of phospholipids shown in Figure 1 as component molecules for liposomes. These molecules are DPPC,[11] dimyristoylglycero-phosphatidyl-choline (DMPC),[12] palmitoyloleoyl-phosphatidyl-choline (POPC) [13] and palmitoyloleoyl-phosphatidyl-ethanolamine (POPE).[14] As shown in Figure 1, POPC and POPE have different polar-groups ($N(CH_3)_3$ and NH_3), and the hydrophobic chain of DMPC is shorter than that in the other phospholipids. By using the molecular modelling program Materials Studio,[15] 3D-structures of these phospholipids were constructed, and their structures were optimised in water by employing the MM/MD simulation program GROMACS.[16] The GROMOS 43a2 force field [17,18] was used in the optimisation.

In order to elucidate the difference in the deformation process for different kinds of liposomes, we here constructed two types of models for liposomes: (i) same-number liposome (SNL) which has the same number of phospholipid molecules located on the inner and the outer layers of the liposome membrane, and (ii) same-density liposome (SDL) which has the same density of molecules in the inner and the outer layers of the liposome. It is noted that liposomes produced by experiments have a large variation in density, and that the density is somewhere between those for SNL and SDL. We here employed the SNL and SDL models to elucidate the dependence of density on the structure and thermal stability of liposomes. Because liposome structures were not elucidated at an

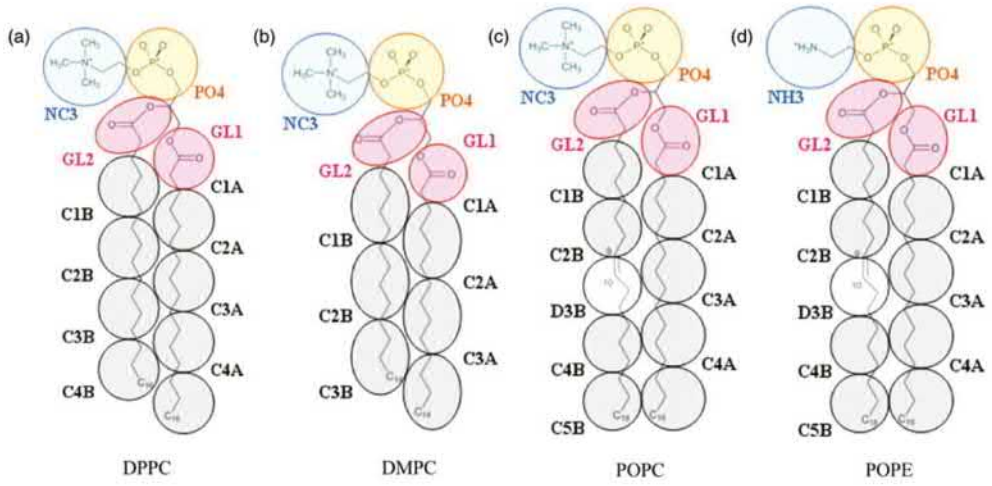


Figure 1. (Colour online) Correspondence relationship between the atomistic and the coarse grained models for phospholipid molecules: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC and (d) POPE.

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

atomic level by experiments, we first constructed a phospholipid dimer, in which two phospholipid molecules are arranged in the opposite directions to each other, and the distance between the phospholipids was determined to fit the phospholipid density of liposome. The dimers were arranged evenly on the surface of a sphere using liposome diameter as a parameter of the model. The density of phospholipids on the internal surface of liposome was specified as an initial condition. In the liposomes of SDL type, the inner and the outer layers of liposome were independently constructed from single properly oriented phospholipid molecules. The monomers of phospholipid were evenly arranged on the both surfaces in the way that the densities of phospholipids in the both layers are similar to each other. In the small-size liposomes, the areas of the internal and the external surfaces are significantly different. Therefore the number of phospholipid molecules in the two layers is largely different in the SDL-type liposomes.

In the previous CG–MD simulation,[19] the spontaneous formation of vesicle from a random aggregate of DMPC molecules was observed. In addition, the relaxation of lipids between the inner and the outer layers of liposomes was facilitated by the temporary insertion of artificial pores in the CG–MD simulation.[20] These CG–MD simulations are too time-consuming to carry out for a variety of liposomes composed of different types of lipids by our computers. We thus employed the SNLs and SDLs as the initial structures in our CG–MD simulations, as a first step of our CG–MD study for liposomes.

In the CG-model, the neighbouring atoms in a molecule are grouped into a bead, which represents an elemental structure unit. Figure 1 shows the CG-models for the phospholipids employed in the present study. The transfer from the atomistic model to the CG model was performed by using the fg2cg tool in the GROMACS program package. This tool was developed by Marrink's group [21] and can also reconstruct the atomistic details from the CG structure.

To create the initial structure of the solvated liposome, we preliminarily optimised the structure of liposome in vacuum by using the classical MM/MD simulation program GROMACS.[16] In the CG model, we used MARTINI force field developed by Marrink et al. [22,23] because the previous CG-MD simulations [23] showed that this force field leads to improved behaviour of lipid bilayers in terms of the stress profile across the bilayer and its tendency to form pores.

The gas-phase optimised structure of liposome was immersed in the cubic water box of the size of $40 \times 40 \times 40$ nm, which is 1.6 times that of the solute. It is noted that the internal cavity of the liposome is filled by water molecules having the same density as the water box. This gave us the initial structure of the solvated liposome. The structure was fully optimised under the periodic boundary condition by using the MARTINI force field. The threshold value of the maximum atomic force for checking the convergence of optimisation was set to 0.04184 kJ/mol/nm, which is the default value in GROMACS.[16]

The dynamical properties of the solvated liposomes were investigated in the CG–MD simulations to elucidate the trend of the change in structure of the eight types of liposomes. The periodic boundary condition and the MARTINI force field were used in the simulations. The MD simulations were conducted under the NPT ensemble for the duration of 100 or 200 ns using a time step of 40 fs. The constant temperature was maintained by using the Berendsen thermostat,[24] and the pressure was controlled to be 3.0×10^{-5} bar^{-1} by using the Parrinello-Rahman barostat.[25]

3. Results and discussion

3.1 Structures of SNL and SDL optimised by CG–MM method

In the present study, we constructed eight types of liposomes whose structural data are listed in Table 1. For the four types of SNLs, each consisting of 3278 lipids, the diameter and the thickness of membrane were set to 25 and 4.5 nm, respectively. The diameter of liposome was defined for its external surface, while the thickness was defined as the distance between the internal and the external surfaces. The number of lipids was determined as the area per lipid on the internal surface to be 0.49 nm^2. For the four types of SDLs, the same diameter of 25 nm was set, whereas the thickness depends on the length of lipid molecules, as listed in Table 1. It is noted that the numbers of lipids in the inner and the outer layers of SDL were determined in order that the density of lipids on the internal surface and the bilayer mid-plane may be almost equal to that for SNL. In fact, the area per lipid in the both layers of SDL is 0.49 nm^2. These densities of lipids for our proposed SNLs and SDLs are comparable to that (0.654 nm^2) of the previous study by Risselada et al. [26].

The initial structures for the four types of SNLs in the atomistic and the CG models are shown in Figure S1 of the supporting information, and those for the SDLs are shown in Figure S2. In these structures, the polar group and the chain part of lipids are indicated in red and gray, respectively. Compared with SNL, the outer layer of SDL is filled with more lipids and therefore it is more densely covered with the polar groups.

The SNL structures were optimised by the CG–MM method in vacuum and in water. Figure 2 shows the optimised structures in water, indicating that the SNLs keep their spherical shapes, although noticeable hydrophobic lesions get created on the exterior surface of SNLs due to clustering of polar groups. As listed in Table 2, for the structure optimised in vacuum, the membrane is

Table 1. Number of atoms, number of lipids, thickness of membrane and diameter of SNLs and SDLs composed of the four types of phospholipid molecules.

	Lipid	Number of atoms	Number of lipids	Lipid length (nm)	Membrane thickness (nm)	Diameter (nm)
SNL	DPPC	163,883	3278	2.7	4.5	25.1
	DMPC	150,784	3278	2.5	4.5	25.0
	POPC	170,440	3278	2.9	4.6	25.1
	POPE	170,427	3278	2.8	4.5	25.0
SDL	DPPC	184,569	1255/2437 3692	2.7	5.5	25.0
	DMPC	183,954	1440/2560 4000	2.5	5.0	25.0
	POPC	179,398	1117/2334 3451	2.9	5.9	25.0
	POPE	188,209	1217/2403 3620	2.8	5.6	25.0

Note: For the SDLs, the numbers of lipids in the inner and the outer layers are listed in the first line along with the total number of lipids in the second line.

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

significantly thinner than that for the structure optimised in water. This result seems to come from the imbalance of electrostatic versus hydrophobic interactions in the gas phase. The effect of solvation on the membrane thickness is about 1.4 nm, which is significant. Therefore, hereafter, we considered the effect of solvation explicitly.

Table 2 indicates an interesting observation regarding the diameter of SNLs. The SNL constructed from DMPC has the diameter at least by 2 nm smaller in comparison with the liposomes having other lipid compositions. The difference mainly comes from the short hydrophobic chains of DMPC as shown in Figure 1. We furthermore analysed the radial distribution of lipids for the four types of SNLs. The results in vacuum and in water are compared in Figure 3(a), (b), indicating that the distribution becomes broader due to solvation effects, and that the distribution for DMPC shifts towards shorter distance compared with the other three SNLs. It is also elucidated from Figure 3(b) that the density of lipids in the outer layer is significantly larger than that in the inner layer for the DPPC, POPC and POPE SNLs, indicating the movement of lipids from the inner layer to the outer layer of the SNLs by the MM optimisation in water. This movement is likely to be caused from the high frustration of lipids in the inner layer of the SNLs.

The structures of SDLs optimised in water by the CG–MM method are shown in Figure 4. The surfaces of liposomes composed of DPPC and DMPC lipids are uniformly filled with the polar groups of the lipids, while some hydrophobic lesions get created on the exterior surface of POPC and POPE SDLs. The radial distributions of lipids for the four types of SDLs are compared in

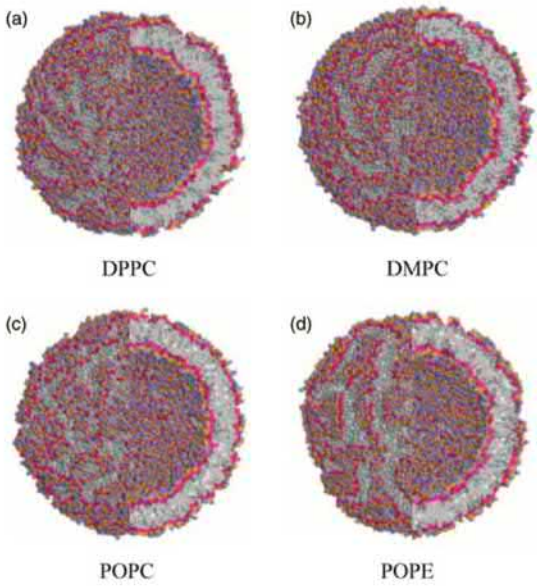


Figure 2. (Colour online) Structures of SNLs optimised in water by CG–MM method: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC and (d) POPE.

Table 2. Averaged thickness of the membrane and the diameter (nm) of the SNLs and SDLs optimised by MM method in vacuum and in water, and those values from 100 ns MD simulations at 310 and 360 K.

Liposome	Lipid	MM-opt in vacuum	MM-opt in water	MD simulation in water	
				310 K	360 K
SNL	DPPC	3.8/25.2	5.2/25.2	5.1/25.8	5.5/26.5
	DMPC	3.9/22.4	5.2/23.2	5.4/23.5	4.9/24.1
	POPC	4.1/25.2	5.5/26.2	5.3/26.7	5.3/27.5
	POPE	4.2/25.1	5.6/25.8	5.1/25.7	5.2/26.5
SDL	DPPC	4.6/21.6	6.2/23.4	6.6/24.8	–
	DMPC	4.3/22.0	6.1/23.7	6.1/25.0	–
	POPC	5.2/22.3	6.3/23.6	7.4/25.2	–
	POPE	5.2/22.3	6.7/24.0	7.2/24.9	–

Note: Because the structures of SDLs at 360 K were completely deformed into a non-spherical form, their thicknesses and diameters are not listed.

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

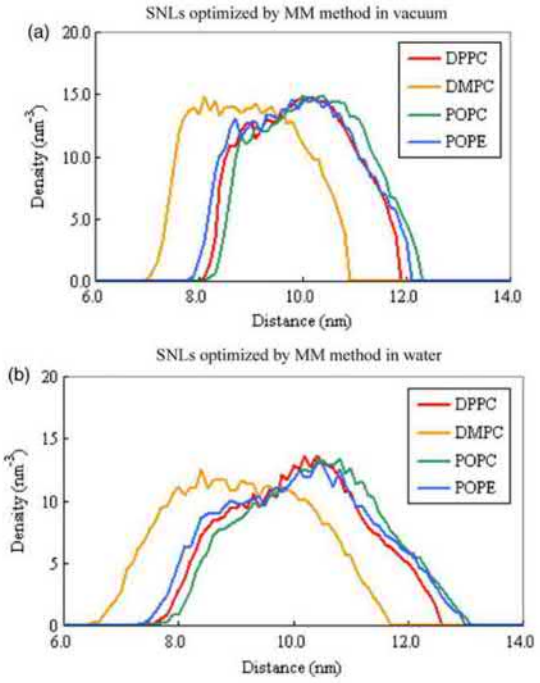


Figure 3. (Colour online) Radial distribution of lipids for the four types of SNLs optimised (a) in vacuum and (b) in water by the CG–MM method. The distance is measured from the center of the SNLs.

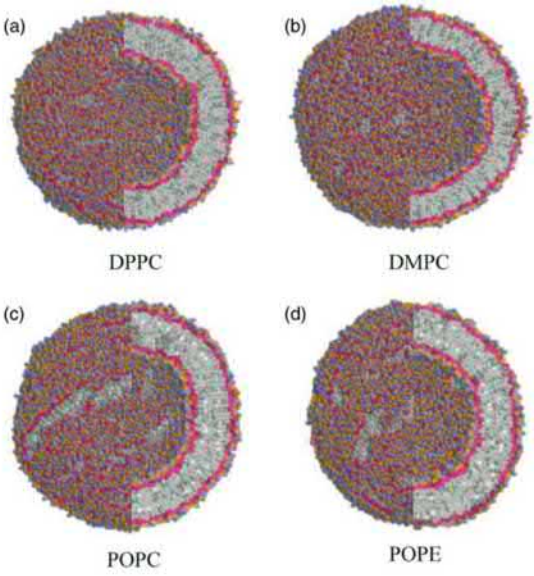


Figure 4. (Colour online) Structures of SDLs optimised in water by CG–MM method: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC and (d) POPE.

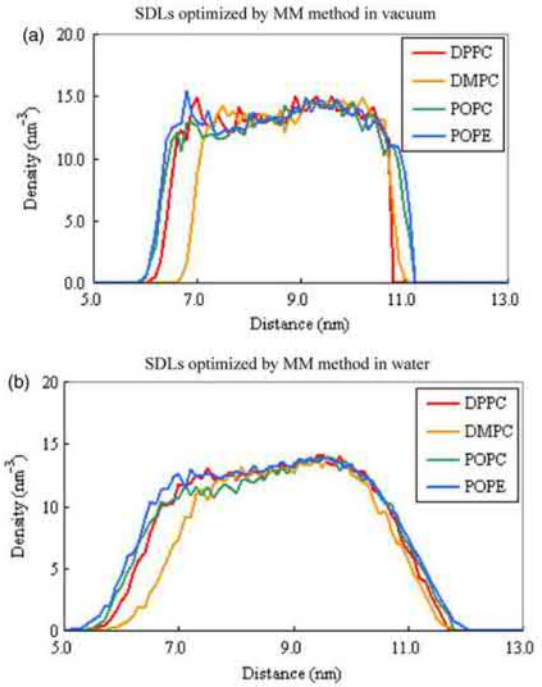


Figure 5. (Colour online) Radial distribution of lipids for the four types of SDLs optimised (a) in vacuum and (b) in water by the CG–MM method.

Figure 5, indicating that the distribution becomes broader due to solvation, and that there is no pronounced difference between the four types of SDLs. In addition, the comparison between Figures 3(b) and 5(b) suggests that the SDLs have a more levelled distribution of lipids. We will analyse this fact later from the point of thermal stability of the membranes of SNL and SDL types.

3.2 Change in structure of SNL and SDL studied by CG–MD simulations

Starting from the MM-optimised structures of the solvated SNLs shown in Figure 2, their dynamical properties were investigated at 310 and 360 K by using the CG–MD simulations in explicit water under periodic boundary conditions. The change in potential energy during the 100 ns MD simulation is presented in Figure S3 of the supporting information for the four types of SNLs. At 310 K, the energies get quickly stabilised within the first nanosecond, and after that, they gradually decrease during the MD simulation. The time rate of energy decrease at 100 ns is 0.005–0.03% per 10 ns. At 360 K, the potential energies are almost constant and fluctuate with the amplitude of 1.0×10^4 kJ/mol. Therefore, these potential energy curves indicate that 100 ns CG–MD

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

simulation is entirely sufficient to produce the thermally equilibrated structures of SNLs.

The structures obtained from the final 100 ns snapshot of the CG–MD simulations in water are shown in Figure 6. Compared with the gas-phase optimised structures, one can see that the polar groups of lipids located on the exterior layer are now evenly distributed, i.e. the explicit solvent and thermal equilibration have repaired the initially appearing hydrophobic lesions on the outer surface of SNLs shown in Figure 2. Even at 360 K, the SNLs keep their spherical shape in water, although the diameter of SNL is enlarged by the thermal fluctuation at 360 K, as detailed in Table 2. The radial distributions of lipids and solvating water molecules are compared in Figure 7(a), (b), respectively. By increasing the temperature, the distribution of lipids shifts to the longer distance, meaning the expansion of SNLs. However, at 360 K, there are no signs of separation of lipid molecules from the surface of SNLs. The density of the lipids is almost the same in the inner and the outer layers, indicating the movement of lipids from the outer layer to the inner layer by the MD simulations. The comparison between Figures 3 (b) and 7(a) indicates that the size of the SNLs is increased by the thermal fluctuation, leading to the release of frustration of the inner lipids. As a result, lipids become easy to move from the outer layer to the inner layer of SNL, so that the density of lipids is almost the same in both the layers of the SNL at 310 and 360 K, as indicated in Figure 7(a). As for the solvating water molecules, Figure 7 (b) indicates that the distribution of the waters is also shifted in accordance with the lipid distribution. No penetration of water molecules between the inner and the outer regions of the SNLs is observed.

Interestingly, the density of water molecules inside the SNLs shows significant fluctuation both at 310 and 360 K. This fluctuation seems to cause the expansion of the SNLs structures. As listed in Table 2, the SNL composed of DPPC at 310 K has 25.8 nm diameter and 5.1 nm thickness, which is larger than that (4.06 nm) obtained by the previous simulations by Risselada et al. [26]. In our MD simulations, a large number of water molecules penetrate into the outer layer of SNL. As a result, the thickness of bilayer is increased by the effect of solvation.

We furthermore conducted the CG–MD simulations from 100 to 200 ns at 360 K, in order to confirm whether the structure of the four types of SNLs can keep their spherical shapes or not. The structure of the snapshot at 200 ns for the SNL composed of DMPC keeps its spherical shape even at 360 K, as shown in Figure S4 of the supporting information. Similar spherical structures were obtained at 200 ns for the other SNLs. It is thus elucidated that the SNLs composed of each of the phospholipid molecules shown in Figure 1 keep their spherical shape in water, indicating that the SNLs are suitable as a drug carrier in drug delivery systems.

To elucidate the change in structure during the MD simulations, we analysed the RMSD between the MD snapshots and the MM-optimised structure for the SNLs.

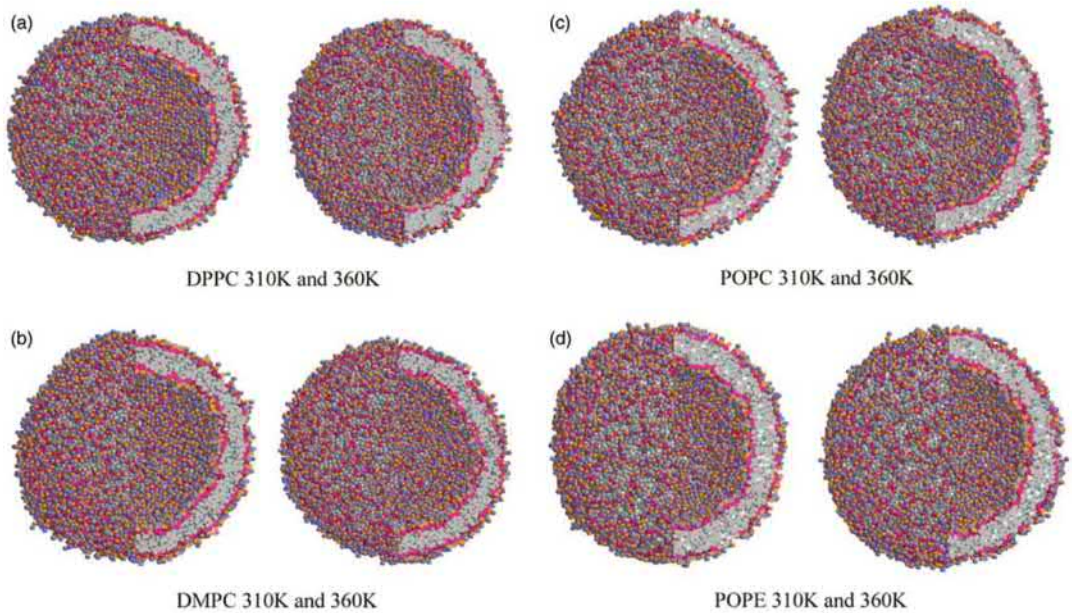


Figure 6. (Colour online) Structure of SNLs obtained by CG–MD simulations at 310 and 360 K: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC and (d) POPE.

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

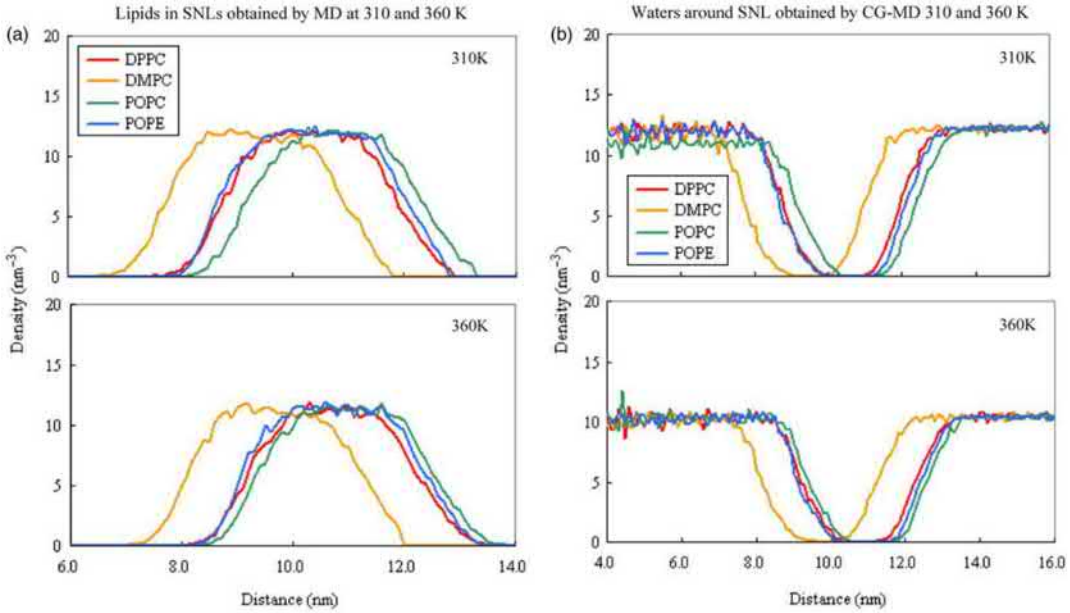


Figure 7. (Colour online) Radial distribution of (a) lipids and (b) water molecules for the SNL structures obtained by CG–MD simulations.

As indicated in Figure S5 of the supporting information, the RMSD at 310 K is less than 2.0 nm and is rather levelled. On the other hand, at 360 K, the RMSD rapidly and continuously increases even after 100 ns. Therefore, it is expected that the structures of the SNLs will be significantly reorganised or deformed at 360 K.

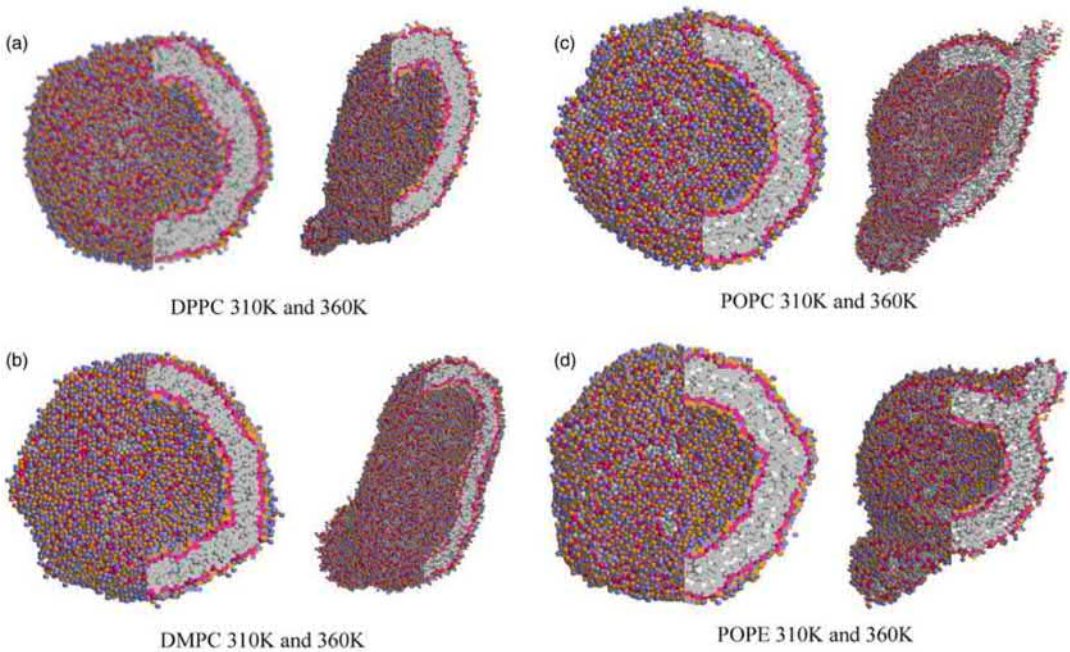


Figure 8. (Colour online) Structure of SDLs obtained by CG–MD simulations at 310 and 360 K: (a) DPPC, (b) DMPC, (c) POPC and (d) POPE.

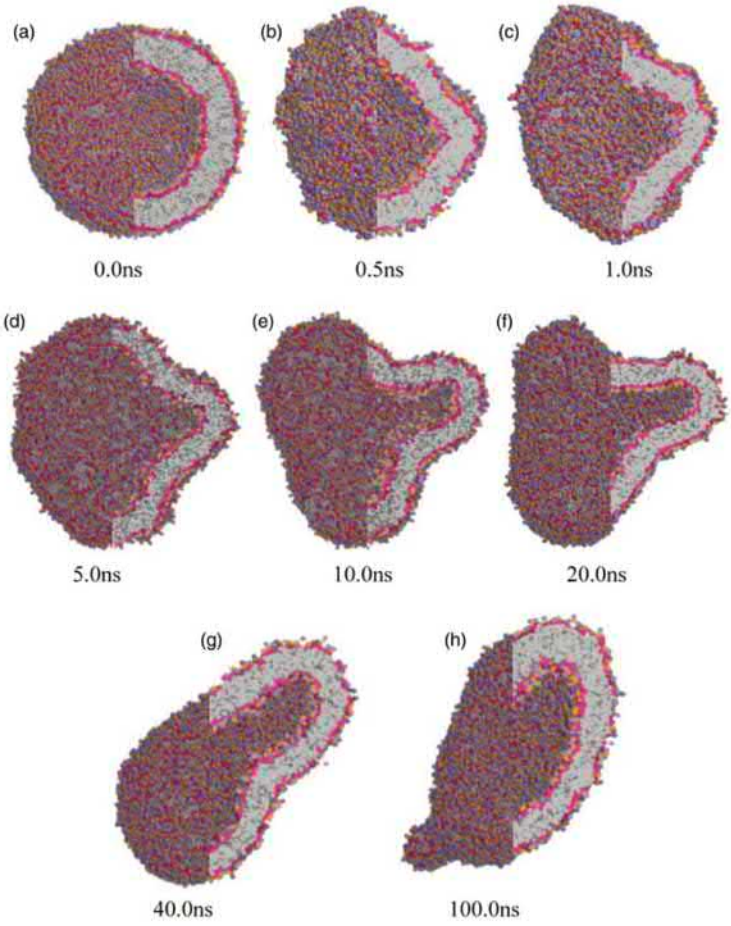


Figure 9. (Colour online) Change in structure of DPPC-SDL at 360 K: (a) 0 ns, (b) 0.5 ns, (c) 1 ns, (d) 5 ns, (e) 10 ns, (f) 20 ns, (g) 40 ns and (h)100 ns.

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

Using the same approach as above, 100 ns CG–MD simulations were carried out for the four types of SDLs in water at 310 and 360 K. The structures obtained from the 100 ns snapshot are compared in Figure 8. At 310 K, all the SDLs keep their spherical shape, although the structures are largely deformed, as shown in the left-hand side in Figure 8. In contrast, significant structural changes emerge upon performing MD simulation at 360 K. As a result, the SDL structures distort to non-spherical overloaded shapes with bulging deformations starting to appear on the outer surface, as shown in the right-hand side in Figure 8. Similar deformations were observed for the vesicles composed of DPPC in the previous simulation by Risselada et al. [26]. They concluded that an excessive number of lipids results in the formation of very floppy and irregular-shaped vesicles. In order to trace the change in the structure, we moreover investigated a series of snapshots from the CG–MD simulation of SDL-DPPC. As indicated in Figure 9, at 0.5 ns the SDL deforms into a non-spherical shape (Figure 9(b)); after 1 ns, a part of the bilayer starts bulging outward. This part eventually becomes a crust layer, as shown in Figure 9(h). These results suggest that SDLs technically can maintain a spherical shape at 310 K. However, the lipid bilayer of SDL is not strong enough to withstand the test by higher temperature. Because of that, some part of the membrane is pushed out of the liposome, resulting in the structure shown in Figure 9(e), (f),(h).

4. Conclusions

In the present work, we studied eight types of liposome models constructed from four different phospholipid molecules combined with two possible bilayer organisations, and investigated the change in structure of liposomes by using the coarse-grained molecular

Downloaded by [University of Sussex Library] at 10:26 26 March 2015

dynamics (CG–MD) simulations in explicit water under periodic boundary conditions. The model having the same number of lipids (SNL) in the inner and the outer layers was compared against the model having the same density of lipids (SDL) in both the layers of the membrane, in order to elucidate the dependence of thermal stability of liposomes on the density of lipids. The performed CG–MD simulations led to the following conclusions:

(1) SNLs keep their spherical shape even at 360 K, indicating their greater structural stability to the thermal fluctuation over SDLs.
(2) The SNL composed of DMPC has a spherical shape with the smallest diameter even at 360 K, being suitable as a material to generate durable liposomes for biotechnological applications.
(3) SDLs might have an ideal geometric structure as a liposomebecause their outer surface is uniformly populated with the polar groups of lipids at 310 K. However, at 360 K, SDLs are significantly deformed into non-spherical shapes.

Acknowledgements

We thank Dr Victor Anisimov for helpful discussions during the manuscript preparation.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study is supported by Open Partnership Joint Projects of JSPS Bilateral Joint Research Projects between Toyohashi University of Technology and the three institutes of National Academy of Science of Ukraine [grant number 22650061].

Supplemental data

Supplemental data for this article can be accessed here.

References

[1] Kamiya K, Tsumoto K, Yoshimura T, Akiyoshi K. Cadherin-integrated liposomes with potential application in a drug delivery system. Biomaterials. 2011;32(36):9899–9907. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.008.

[2] Xiang TX, Anderson BD. Liposomal drug transport: a molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(12–13):1357–1378. doi:10.1016/j.addr.2006.09.002.

[3] Hama S, Uenishi S, Yamada A, Ohgita T, Tsuchiya H, Yamashita E, Kogure K. Scavenging of hydroxyl radicals in aqueous solution by astaxanthin encapsulated in liposomes. Biol Pharm Bull. 2012;35(12):2238–2242. doi:10.1248/bpb.b12-00715.

[4] Winter ND, Schatz GC. Coarse-grained molecular dynamics study of permeability enhancement in DPPC bilayers by incorporation of lysolipid. J Phys Chem B. 2010;114(15):5053–5060. doi:10.1021/jp911309s.

[5] Shinoda W, DeVane R, Klein ML. Computer simulation studies of self-assembling macromolecules. Curr Opin Struct Biol. 2012;22(2):175–186. doi:10.1016/j.sbi.2012.01.011.

[6] Lyubartsev AP. Multiscale modeling of lipids and lipid bilayers. Eur Biophys J. 2005;35(1):53–61. doi:10.1007/s00249-005-0005-y.

[7] Sevink GJA, Charlaganov M, Fraaije JGEM. Coarse-grained hybrid simulation of liposomes. Soft Matter. 2013;9(10):2816–2831. doi:10.1039/c2sm27492b.

[8] De Vries AH, Mark AE, Marrink SJ. Molecular dynamics simulation of the spontaneous formation of a small DPPC vesicle in water in atomistic detail. J Am Chem Soc. 2004;126(14):4488–4489. doi:10.1021/ja0398417.

[9] Marrink SJ, Mark AE. Molecular dynamics simulation of the formation, structure, and dynamics of small phospholipid vesicles. J Am Chem Soc. 2003;125(49):15233–15242. doi:10.1021/ja0352092.

[10] Kalra J, Bally MB. Liposomes. In: Uchegbu IF, Cheng AG, Lalatsa WP, editors. Fundamentals of pharmaceutical nanoscience. New York: Springer Science and Business Media, Chapter 3, 27–64, 2013.

[11] Róg T, Murzyn K, Milhaud GM, Karttunen J, Pasenkiewicz-Gierula M. Water isotope effect on the phosphatidylcholine bilayer properties: a molecular dynamics simulation study. J Phys Chem B. 2009;113(8):2378–2387. doi:10.1021/jp8048235.

[12] Coppock PS, Kindt JT. Atomistic simulations of mixed-lipid bilayers in gel and fluid phases. Langmuir. 2009;25(1):352–359. doi:10.1021/la802712q.

[13] Olaru A, Wohland M, David S, Gheorghiu E, Gheorghiu T. Assessment of the multiphase interaction between a membrane disrupting peptide and a lipid membrane. J Phys Chem B. 2009;113(43):14369–14380. doi:10.1021/jp905170u.

[14] Mori K, Hata M, Neya S, Hoshino T. MD simulation of asymmetric phospholipid bilayers with ions and cholesterols. Chem-Bio Inform J. 2004;4(1):15–26. doi:10.1273/cbij.4.15.

[15] Materials Studio (MS). v4.1 packages, San Diego, CA: Accelrys. 2006.

[16] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem. 2005;26(16):1701–1718. doi:10.1002/jcc.20291.

[17] Schuler DS, Van Gunsteren FG. On the choice of dihedral angle potential energy functions for *n*-alkanes. Mol Simul. 2000;25(5):301–319. doi:10.1080/08927020008024504.

[18] Schuler DS, Daura D, Van Gunsteren FG. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. J Comput Chem. 2001;22(11):1205–1218. doi:10.1002/jcc.1078.

[19] Shinoda W, DeVane R, Klein ML. Zwitterionic lipid assemblies: molecular dynamics studies of monolayers, bilayers, and vesicles using a new coarse grain force field. J Phys Chem B. 2010;114(20):6836–6849. doi:10.1021/jp9107206.

[20] Risselada HJ, Marrink SJ. Curvature effects on lipid packing and dynamics in liposomes revealed by coarse grained molecular dynamics simulations. Phys Chem Chem Phys. 2009;11(12):2056–2067. doi:10.1039/b818782g.

[21] Rzepiela AJ, Schäfer LV, Goga N, Risselada HJ, De Vries AH, Marrink SJ. Reconstruction of atomistic details from coarse-grained structures. J Comput Chem. 2010;31:1333–1343.

[22] Marrink JM, De Vries HV, Mark EM. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. J Phys Chem B. 2004;108(2):750–760. doi:10.1021/jp036508g.

[23] Marrink JM, Risselada R, Yefimov Y, Tieleman T, De Vries HV. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. J Phys Chem B. 2007;111(27):7812–7824. doi:10.1021/jp071097f.

[24] Berendsen HJC, Postma JPM, Van Gunsteren WF, Dinola AD, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. J Chem Phys. 1984;81(8):3684–3690. doi:10.1063/1.448118.

[25] Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. J Appl Phys. 1981;52(12):7182–7190. doi:10.1063/1.328693.

[26] Risselada HJ, Mark AE, Marrink SJ. Application of mean field boundary potentials in simulations of lipid vesicles. J Phys Chem B. 2008;112(25):7438–7447. doi:10.1021/jp0758519.

РОЗДІЛ 3
СТВОРЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ

В розділі ІІІ представлено метод отримання і характеристики ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування і ліпосомальної форми куркуміну.

Для захисту АТР від руйнування за перорального застосування досліджено використання ліпосомальної форми АТР. Виготовлення ліпосомальної форми АТР здійснювали модифікованим методом «заморожування – танення», як найбільш ефективного для включення АТР у ліпосоми. Розміри ліпосом визначали методом динамічного світлорозсіювання, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр. Розміри переважної більшості ліпосом (W за кількістю = 91%) були в діапазоні від 30 до 100 нм. Вплив ліпосомальної форми АТР на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження. Експериментальних тварин поміщали в резервуар заповнений водою. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомальної форми АТР оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з контрольними групами, які отримували АТР у вільному вигляді. Уведення ліпосомальної форми АТР сприяло підвищенню фізичної працездатності лабораторних тварин за одноразового споживання протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг на 62%, у дозі 60 мг/кг — на 76%. а протягом 12 днів — на 64% і 93%, відповідно, в порівнянні із застосуванням АТР у вільному вигляді за аналогічного дозування. Ліпосомальну форму куркуміну отримували випарюванням суміші фосфоліпідів, холестеролу, поліетиленгліколю і розчину куркуміну до утворення ліпідної плівки, з наступною гідратацію і екструзію через мембрани. Співвідношення масових частин SFL, холестеролу та

поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, забезпечує отримання ліпосомальної форми куркуміну з урахуванням хіміко-фізичних властивостей куркуміну та залежності ефективності інкапсульованих зразків від розмірів везикул (важливий технологічний показник процесу). Для надання ліпосомам прийнятної жорсткості SFL і холестерол співвіднесені в пропорції 3,65:1,80, а для збільшення тривалості їх перебування в кровообігу, поліетиленгліколь залучали до них у кількості 0,04 масових частин. Розміри ліпосом з інкапсульованим куркуміном, за методом заморожування–танення, були в діапазоні від 98,13 ± 4,80 нм до 111,37 ± 3,13 нм, а методом сонікації – у діапазоні від 101,07 ± 4,11 нм до 114,71 ± 3,48 нм. Послідовна екструзія, з використанням мембран з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм., відповідно, забезпечує отримання стерильних ліпосомальних форм куркуміну з зовнішним діаметром ліпосом 52,47 ± 2,61нм. Ефективність включення (ЕЕ) АТР у ліпосоми, з вірогідністю $P = 0,95$ становила для метода заморожування – танення 84,49 ± 2,64%, а куркуміну у ліпосоми становила для методів заморожування – танення та сонікації 83,49 ± 3,52%., а для екструзії через мембрани 95,34 ± 3,76%.

3.1 Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування

BIOTECHNOLOGIA ACTA, V. 6, No3, 2013

УДК 547.953:615.012:665.372

СТВОРЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОСОМНОЇ ФОРМИ АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТУ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

О. В. Хробатенко[1]
Н. В. Притульська[1]
С. М. Шульга[2]

[1]Київський національний торговельно-економічний університет, Україна
[2]ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 27.02.2013

Досліджено використання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату для перорального введення. Наведено методи одержання і визначення розмірів ліпосом та відсоткового вмісту в них аденозин-5-трифосфату. Вивчено вплив ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату на фізичну працездатність лабораторних тварин методом плавання до граничного виснаження. Показано, що застосування ліпосомної форми порівняно з вільним аденозин-5-трифосфатом (за аналогічного дозування) сприяло підвищенню працездатності лабораторних тварин. За одноразового введення ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг підвищилась працездатність на 62%, а в дозі 60 мг/кг – на 76%, 12 днів – на 64% і 93%, відповідно.

Ключові слова: аденозин-5-трифосфат, ліпосоми, ліпосомна форма аденозин-5-трифосфату, фізична працездатність.

Аденозин-5-трифосфат (АТФ) — нуклеотид, який відіграє роль універсального джерела енергії для біохімічних процесів, що відбуваються в організмі людини [1]. За активації м'язової діяльності гідроліз АТФ пришвидшується й інтенсивність енергетичного обміну зростає в 100–1 000 разів порівняно зі станом спокою. Проте запасів АТФ вистачає лише на перші 2–3 с рухової активності, після чого організмові доводиться їх поновлювати [2].

Концентрація АТФ у м'язах відображає баланс між швидкістю ресинтезу АТФ та швидкістю його утилізації. Величина концентрації, навіть під час довільного скорочення м'язів, завжди є досить стабільною. З підвищенням активності скорочення м'язів підвищується ступінь утилізації АТФ, що пов'язано зі значним збільшенням активності ензимів, які беруть у цьому участь. Із фізіологічного погляду зниження швидкості використання АТФ призводить до розвитку втоми або неспроможності м'язів виконувати необхідну роботу. У цій ситуації втома виконує роль захисного бар'єра, який забезпечує підтримку достатнього рівня АТФ у тому разі, коли механізми його ресинтезу не дають змоги задовольнити потребу в цій сполуці. Пригнічення АТФазної активності призводить до зниження швидкості утилізації АТФ, що перешкоджає надмірному зменшенню його рівня в м'язовому волокні [3].

Додаткове споживання АТФ дає змогу поповнювати енергетичні ресурси організму, сприяє адаптації до інтенсивних фізичних навантажень, підвищенню фізичної працездатності та прискоренню процесів відновлення. Однак через дуже короткий період напіврозпаду в крові виникає проблема складності доставлення АТФ до клітин. За екзогенного надходження АТФ швидко руйнується під дією позаклітинних ензимів до аденозиндифосфату (рис. 1), а потім до аденозинмонофосфату і аденозину [2].

Окрім того, АТФ, як й інші гідрофільні аніони, не може потрапити до клітини через плазматичну мембрану. Вищезазначені фактори унеможливлюють використання АТФ як біоенергетичного субстрату [4–7].

У пошуках альтернативного способу захисту від руйнування за перорального застосування АТФ було досліджено ліпосомні форми АТФ. Широкі можливості застосування ліпосом (замкнених везикул, оточених одним або декількома шарами ліпідів),

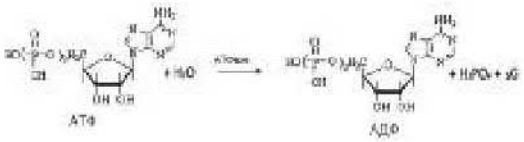


Рис. 1. **Реакція розпаду АТФ**

зумовлені сукупністю їхніх біологічних властивостей: хімічною інертністю, біосумісністю, відсутністю токсичності [8]. Ліпосоми здатні спрямовано доставляти біологічно активні речовини у потрібні органи і тканини організму.

Ліпосоми використовують у медицині і харчовій промисловості. Також як вектори їх застосовують у генній терапії.

Ефективність ліпосомної форми АТФ було продемонстровано в низці досліджень. Зокрема, в роботі [9] показано позитивний ефект застосування ліпосомної форми АТФ для захисту ендокринних клітин людини від нестачі енергетичних ресурсів у моделі клітинної культури сепсису. У роботі [10] встановлено, що використання ліпосомної форми АТФ дає змогу компенсувати більшу кількість ішемічних виявів, допустимих перед зниженням електричної активності мозку і остаточним руйнуванням його клітин. У роботах [5, 6] показано, що ліпосомна форма АТФ захищає клітини міокарда від ішемічних і реперфузійних ушкоджень. У вищезазначених роботах ліпосомні форми АТФ уводили парентерально.

Мета роботи полягала у виборі оптимального способу отримання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування та дослідження ефективності споживання ліпосомної форми АТФ з метою підвищення фізичної працездатності.

Матеріали і методи

Виготовлення ліпосомної форми АТФ здійснювали, використовуючи метод заморожування-відтавання, що є найбільш ефективним для включення АТФ у ліпосоми [4]. Для отримання ліпосом брали суміш соняшникового лецитину (ВАТ «НВЦ Дніпротехнології», Україна), холестеролу (AppliChem GmbH, Німеччина) і поліетиленгліколю (A.C.E.F. S.p.A., Італія) у масовому співвідношенні 2,45:1:0,04. Підготовлену суміш розчиняли в органічному розчиннику та випарювали в ротаційному випарювачі до утворення ліпідної плівки. Процес гідролізу ліпідної плівки проводили за температури 40 °С розчином АТФ (Sigma, США) за концентрації 20 ммоль/л протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів заморожування-відтавання. Заморожування проводили за температури –80 °С, танення — на водяній бані за +30 °С [11]. Розчин АТФ, що не ввійшов у ліпосоми, відділяли центрифугуванням [4]. Одержаний розчин пропускали через екструдер із мембранами, діаметром пор 200 і 100 нм.

Вміст включеного в ліпосоми АТФ визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (Dionex Ultimate 3000, колонка Discovery C18 250×4,6 мм, 5 мкм, Supelco (США), аналіз проводили в ізократичних умовах, рухома фаза — суміш 0,1 моль буфера KH_2PO_4 і метанолу у співвідношенні 96:4 v/v за швидкості потоку 1 мл/хв, λ = 254 нм [4–7]).

Розмір ліпосом обчислювали за допомогою динамічного світлорозсіювання, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Великобританія) [12]. Спектрометр дає змогу встановити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині, аналізуючи характерний час флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної суспензії ліпосомної форми АТФ, здійснювали за температури 25 °С під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Результати розподілу за розмірами в одиницях інтенсивності та кількісному вимірі одержали з аналізу кореляційної функції з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення Zetasizer Software 6.20.

Для визначення біодоступності ліпосомної форми АТФ було використано 50 білих лінійних мишей-самців з масою тіла 22–28 г. Дослідні тварини перебували у віварії за температури повітря 20–24 °С, вологості — не більше 65%, у режимі «день-ніч». Тварини знаходились у металевих клітках достатнього розміру, на стандартному раціоні віварію і отримували питну воду та корм *ad libitum* [13]. Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–IV Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2011 рр.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», Страсбург, 1985 [14]. Протокол дослідів було погоджено Комісією

з біоетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Методом випадкової вибірки тварини було розподілено на 5 груп по 10 особин:

- перша — інтактна група тварин, яких утримували за стандартних умов віварію (контроль);
- друга — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- третя — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 60 мг/кг;
- четверта — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- п'ята — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 60 мг/кг.

Результати досліджень зі встановлення активності АТФ [15, 16] було враховано під час вибору доз. Ліпосомну форму АТФ і АТФ у вільному вигляді вводили за 5 хв до початку експерименту.

Вплив ліпосомної форми АТФ на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження [17].

Експериментальних тварин поміщали в резервуар діаметром 1,5 м, завглибшки 0,8 м, заповнений водою з температурою 28–32 °С. З води попередньо видаляли бульбашки повітря шляхом кип'ятіння. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомної форми АТФ оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з контрольними групами, які отримували АТФ у вільному вигляді [17]. Експеримент проводили на 6-ту та 12-ту добу за щоденного споживання мишами ліпосомної форми АТФ. В інші дні миші виконували тренувальне плавання в резервуарі без вантажу протягом 15 хв.

Статистичну обробку результатів проводили шляхом розрахунку середніх арифметичних величин, їх середньоквадратичних відхилень і похибок. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними за $P \le 0{,}05$ [18].

Результати та обговорення

Ефективність включення АТФ у ліпосоми визначали методом високоефективної рідинної хроматографії.

Після статистичної обробки отриманих даних кількість АТФ, включеного в ліпосоми, з вірогідністю $P = 0{,}95$ становила 41,7±0,9%. Одержані результати свідчать про відносно високий рівень включення АТФ, що співвідноситься з даними літератури [4].

Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла й інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок в розчинах і за рівнянням Стокса встановити розподіл наночастинок за розміром. Вимірювання повторювали 4 рази з усередненням результату (рис. 2, *а*). Діапазон дисперсності ліпосом в одиницях інтегральної інтенсивності розсіювання виявився досить широким (рис. 2, *б*). За результатами проведених досліджень було встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною.

Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах від 30 до 1 000 нм, хоча розміри переважної більшості ліпосом (W за кількістю = 91%) — в діапазоні від 30 до

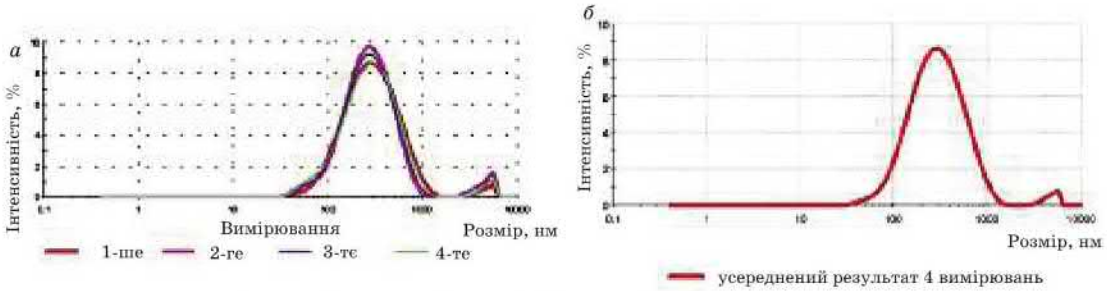


Рис. 2. **Розподіл сумарної фракції ліпосомної форми АТФ за розмірами** (в одиницях інтенсивності)

100 нм (рис. 3, *а*, *б*) і лише незначна кількість фосфоліпідних структур (W за кількістю = 9%) мали розміри, що перевищують 100 нм.

Між рисунками 2 і 3 існує принципова різниця. Перший дає уявлення про інтегральний (сумарний) розподіл всіх частинок (везикул) у розчині. Другий показує конкретне розподілення частинок з вірогідністю $P \le 95\%$ за розмірами (30–100 нм).

Проте розміри останніх настільки великі, що їхня інтегральна інтенсивність розсіювання (W за інтенсивністю = 93%) значно перевищує цей показник для всіх ліпосом, менших за 100 нм (W за інтенсивністю = 7%).

Одержані дані можуть свідчити про наявність у досліджуваному зразку мультиламілярних ліпосом (складаються з багатьох ліпідних шарів, розділених водними фазами, і мають великі розміри) [8].

Результати дослідження функціональної ефективності ліпосомної форми АТФ наведено в таблиці.

Проведені дослідження згідно з методом плавання до граничного виснаження показали, що інтактна група тварин на 6-й день експерименту утримувалась на воді протягом 138,4±5,5с, що співвідноситься з даними літератури [17].

Як випливає з даних таблиці, тривалість утримання на воді 2-ї та 3-ї груп дослідних тварин як на 6-й, так і на 12-й день експерименту достовірно не відрізнялись ($P \le 0,05$) від інтактної групи (контроль) в аналогічний період дослідження. Це підтверджує той факт, що у вільному вигляді АТФ не може слугувати біоенергетичним субстратом [4–7].

Для 4-ї та 5-ї груп тривалість утримання тварин на воді на 6-й день експерименту становила 234,8±5,1 с ($P \le 0,05$) і 237,6±4,7 с ($P \le 0,05$), що на 70% і 91% вище, відповідно, ніж результати інтактної групи. На 12-й день експерименту тривалість утримання тварин на воді 4-ї та 5-ї груп на 71% ($P \le 0,05$) і 106% ($P \le 0,05$), відповідно, перевищувала результати інтактної групи (контролю).

Таким чином, уведення ліпосомної форми АТФ сприяло підвищенню фізичної працездатності лабораторних тварин за одноразового споживання протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг на 62% ($P \le 0,05$), у дозі 60 мг/кг — на 76% ($P \le 0,05$), а протягом 12 днів — на 64% ($P \le 0,05$) і 93% ($P \le 0,05$), відповідно, порівняно із застосуванням АТФ у вільному вигляді за аналогічного дозування.

Одержані дані свідчать про властивість ліпосомної форми АТФ затримувати настання втоми. Введення АТФ у вільному вигляді суттєвим чином не вплинуло на фізичну витривалість лабораторних тварин, що може свідчити про швидку деградацію цієї речовини в організмі.

Слід зауважити, що енергетичний стан м'язової тканини є далеко не єдиним чинником,

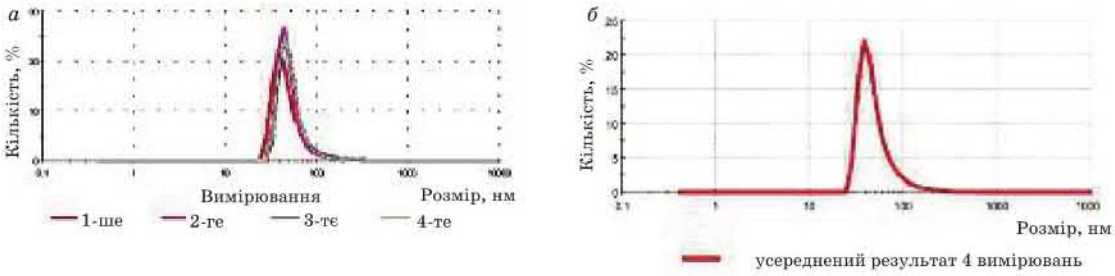


Рис. 3. **Кількісний розподіл ліпосомної форми АТФ за розмірами**

Дослідження ефективності ліпосомної форми АТФ

День експерименту	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група
	Тривалість плавання, с				
6-й	138,4±5,5	144,5±2,7	149,9±4.6	234,8±5,1*	264,3±7,1*
12-й	138,9±6,5	145,2±3,9	148,3±5,1	237,6±4,7*	286,3±9,4*

Примітка: * $P \le 0,05$ порівняно з контролем (перша група).

на який впливає АТФ для запобігання розвиткові втоми [3]. У роботі [15] було зроблено припущення про вплив АТФ на пурин-енергетичні рецептори з наступним метаболічним ефектом. Екзогенні макроергічні нуклеотиди не можуть слугувати субстратом енергетичних шляхів як через незначну їх кількість, так і через швидку метаболічну деградацію. Результати досліджень [15] дають підстави вважати, що такий ефект може бути основним у механізмі актопротекторного впливу нуклеотидів. Відомо, що пуринові нуклеотиди беруть участь у регуляції активності аденілатциклазної системи. Варто зазначити, що ефекти, які спричинюють пуринові нуклеотиди, мають різноспрямований характер, який залежить від специфічності тканини. Крім того, екзогенний АТФ виявляє виражені ангіодилатуючі властивості і, таким чином, може змінювати співвідношення притоку і відтоку метаболітів у функціонально активних органах у бік їх оптимізації.

Таким чином, у результаті проведених досліджень було використано оптимальний спосіб одержання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування, що забезпечив відносно високий рівень включення АТФ у ці частинки. Встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною і в разі використання екструдерів з мембранами відповідних розмірів (200 нм і 100 нм) можна отримати ліпосоми, розміри яких лежать у діапазоні 30–100 нм. Метод плавання до граничного виснаження показав, що використання ліпосомної форми АТФ сприяло збільшенню фізичної витривалості лабораторних тварин порівняно з інтактною групою та групами, яким уводили вільний АТФ.

Одержані дані можуть свідчити про затримку настання втоми пуриновими нуклеотидами. Це підтверджує той факт, що ліпосомна форма АТФ може слугувати біоенергетичним субстратом і застосовуватись для створення харчових продуктів для дієтичного споживання.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Gordon J. L.* Extracellular ATP: effects, sources and fate // Biochem. J. — 1986. — P. 309–319.
2. *Спрайет Л.* Анаэробный метаболизм при высокоинтенсивных физических нагрузках // Метаболизм в процессе физической деятельности / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 9–51.
3. *Грин Г.* Метаболические факторы утомления // Метаболизм в процессе физической деятельности / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 233–286.
4. *Liang W., Levchenko T. S., Torchilin V. P.* Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure // J. Microencapsul. — 2004. — P. 251–261.
5. *Hartner W. C., Verma D. D., Levchenko T. S. et al.* ATP-loaded liposomes for treatment of myocardial ischemia. WIREs. Nanobiotechnol. — 2009. — P. 530–539.
6. *Verma D. D., Levchenko T. S., Bernstein E. A., Torchilin V. P.* ATP-loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model // J. Control. Release. — 2005. — P. 460–471.
7. *Arakawa A., Ishiguro S., Ohki K., Tamai M.* Preporation of liposome-encapsulationg adenosine triphosphate // Tohoku J. Exp. Med. — 1998. — P. 39–47.
8. *Морозова Ю. А.* Липосомальная система доставки антигена вируса ССЯ-76 для пероральной иммунизации птиц: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23. СПб. гос. технолог. ин-т. — СПб., 2003. — 20 с.
9. *Han Y. Y., Huang L., Jackson E. K. et al.* Liposomal ATP or NAD+ protects human endothelial cells from energy failure in a cell culture model of sepsis // Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. — 2001. — P. 107–116.
10. *Laham A., Claperon N., Durussel J. J. et al.* Intracarotidal administration of liposomally-entrapped ATP: improved ef ciency against experimental brain ischemia // Pharmacol. Res. Commun. — 1988. — P. 699–705.
11. *Пат. 77865 UA, A23J 7/00, A61K 9/127, A61K 31/7076.* Спосіб отримання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування / Притульська Н. В., Хробатенко О. В., Шульга С. М. — Заявл. 20.09.2012; Опубл. 25.02.13; Бюл. № 4. — 4 с.
12. *The use of zeta potential measurements* to study sterically stabilized liposomes [Electronic resource] — www.malvern.co.uk.

13. *Науково-практичні* рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. — К.: Авіцена, 2002 р. — 156 с.
14. *European* convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. — Council of Europe, Strasbourg, 1986. — 53 p.
15. *Мороз В. М., Липницкий Т. Н., Кутняк В. П. и др.* Изучение и сравнительная оценка актопротекторной активности АТФ-ЛОНГ в эксперименте // Лік. справа. — 2002. — № 7. — С. 99–101.
16. *Вдовенко Н. В.* Вплив аденозинтрифосфатвмісних сполук на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу за умов інтенсивного фізичного навантаження: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Нац. аграр. ун-т. — К., 2005. — 20 с.
17. *Бобков Ю. Г., Виноградов В. Н.* Фармакологическая коррекция утомления. — М.: Медицина, 1984. — 206 с.
18. *Гублер Е. В., Генкин А. А.* Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 144 с.

СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЫ АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

А. В. Хробатенко[1]
Н. В. Притульская[1]
С. М. Шульга[2]

[1]Киевский национальный торгово-экономический университет, Украина
[2]ГО «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail:shulga5@i.ua

Исследовано использование липосомной формы аденозин-5-трифосфата для перорального введения. Приведены методы получения и определения размеров липосом, а также процентного содержания в них аденозин-5-трифосфата. Изучено влияние липосомной формы аденозин-5-трифосфата на физическую работоспособность лабораторных животных методом плавания до предельного истощения. Показано, что использование липосомной формы по сравнению со свободным аденозин-5-трифосфатом (в аналогичной дозировке) способствовало увеличению работоспособности лабораторных животных. Применение липосомной формы при однократном введении в течение 6 дней в дозе 30 мг/кг способствовало увеличению работоспособности на 62%, в дозе 60 мг/кг — на 76%, 12 дней — на 64% и 93% соответственно.

Ключевые слова: аденозин-5-трифосфат, липосомы, липосомная форма аденозин-5-трифосфата, физическая работоспособность.

CREATING AND INVESTIGATION OF ADENOSINE-5-TRIPHOSPHATE LIPOSOMAL FORMS FOR ORAL APPLYING

O. V. Khrobatenko[1]
N. V. Prytulska[1]
S. M. Shulga[2]

[1]Kyiv National University of Trade and Economics, Ukraine
[2]State Organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail:shulga5@i.ua

Liposomal form of adenosine-5-triphosphate (ATP) for oral applying was studied. The methods of obtaining and determining the size of the liposomes, the definition of ATP percentage content in liposomes were proposed. The effect of liposomal form of ATP on physical performance of laboratory animals by swimming to the limit of exhaustion was studied. It was shown that using of the liposomal form as compared with free ATP (in a similar dose) promoted the increased efficiency of laboratory animals. Application of liposomal form occurring at single administration for 6 days at a dose of 30 mg/kg facilated a 62% increase of efficiency, and 60 mg/kg did 76%, while consumption of liposomal form of ATP for 12 days did 64% and 93%, respectively.

Key words: liposomes, liposomal form ATP, physical performance.

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77865** (13) **U**

(51) МПК (2013.01)
A23J 7/00
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 10974**
(22) Дата подання заявки: **20.09.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.02.2013**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2013, Бюл.№ 4**

(72) Винахідник(и):
Притульська Наталія Володимирівна (UA),
Хробатенко Олександра Віталіївна (UA),
Шульга Сергій Михайлович (UA)

(73) Власник(и):
Притульська Наталія Володимирівна, вул. Братиславська, 9-а, кв. 94, м. Київ, 02126 (UA),
Хробатенко Олександра Віталіївна, вул. Мілютенка, 6-а, кв. 100, м. Київ, 02156 (UA),
Шульга Сергій Михайлович, вул. Вишгородська, 47-б, кв. 105, м. Київ, 04114 (UA)

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТУ (АТФ) ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5'-трифосфату (АТФ) для перорального застосування, шляхом розчинення суміші лецитину, холестерину і поліетиленгліколю в органічному розчиннику, з наступним випарюванням до утворення ліпідної плівки, додаванням розчину АТФ, заморожуванням при -80 °С і таненням при температурі +30 °С, а також відділенням невключених в ліпосоми речовин за допомогою центрифугування. В суміші використовують соняшниковий лецитин, холестерин та поліетиленгліколь у молярному співвідношенні 70:50:0,5 відповідно, здійснюють 10-кратне повторювання циклу заморожування-танення, для забезпечення утворення більш жорстких ліпосом, і ліофільно висушують отримані ліпосоми з АТФ.

UA 77865 U

Корисна модель належить до харчової промисловості і може бути використана для одержання ліпосом, що містять фізіологічно активну речовину - аденозин-5'-трифосфат (АТФ) з метою перорального застосування. Ліпосоми можуть надалі бути використані для виробництва продуктів спеціального дієтичного споживання (використання).

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) - нуклеотид, який відіграє роль універсального джерела енергії для всіх біохімічних процесів, що протікають в організмі людини. Однак, при екзогенному надходженні, молекули АТФ не доставляються до клітин, так як руйнується ферментом ектоАТФ-дифосфорилазою до аденозиндифосфату (АДФ), аденозинмонофосфату (АМФ) і аденозину. Практично весь аденозин поглинається еритроцитами, в яких перетворюється в інозин (рибоксин) за участі ферменту аденозин-диамінази.

Доцільність поміщення АТФ в ліпосоми для захисту від руйнування, доведена низкою досліджень, що підтверджують його ефективність [3, 4].

Відомий спосіб одержання ліпосом, що описаний в [статті: Arakawa A. Preporation of liposome-encapsulationg adenosine triphosphate/ A. Arakawa, S. Ishiguro, K. Ohki, M. Tamai// Tohoku J. Exp.Med.-1998. - P. 39-47] передбачає одержання ліпосом в три стадії. На першій стадії суміш яєчного фосфатидилхоліну і холестерину розчиняють в органічному розчиннику. Утворений розчин випарюють під вакуумом до утворення ліпідної плівки на стінках колби і додають розчин АТФ з розрахунку 100-500 ммоль АТФ на 10-50 ммоль ліпіду. Друга стадія полягає в 5-хвилинній обробці цього розчину ультразвуком при температурі 50 °С. На третій стадії здійснюють відділення ліпосом від невключеного розчину АТФ шляхом гель-фільтрації. Цей метод має низку недоліків: низький відсоток включення АТФ, нестабільність одержаних ліпосом. Окрім того, ліпосоми, отримані цим методом, потрапляючи в кровообіг, швидко руйнуються макрофагами.

Прототипом корисної моделі можна вважати спосіб, що описаний в статті [стаття: Liang W. Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure/ W. Liang, T.S. Levchenko, V.P. Torchilin// Journal of Microencapsulation.-2004. - P. 251-261]. Відповідно до проведених авторами статті досліджень, найбільш ефективним, з-поміж інших, щодо включення АТФ в ліпосоми, виявився метод замороження-танення. Саме він і був взятий за основу при розробці корисної моделі. Для отримання ліпосом відважують яєчний фосфатидилхолін, холестерин і поліетиленгліколь в молярному співвідношенні 70:30:0,5. Поліетиленгліколь використовують з метою подовження тривалості перебування ліпосом в крові. Підготовлену суміш розчиняють в органічному розчиннику, після чого випарюють до утворення ліпідної плівки. Готують розчин АТФ з концентрацію 400 ммоль/л і наливають його в колбу з ліпідною плівкою на стінках, заповнюють аргоном і закупорюють. Плівка поступово гідратує, при цьому колбу помішують протягом 30 хв при 40 °С. Потім здійснюють 5 циклів заморожування при температурі -80 °С і танення на водяній бані при температурі +30 °С. Авторами статті досліджено 3 способи відділення ліпосом від невключеного розчину АТФ: центрифугування, діаліз та фільтрація гелю. Ефективність усіх 3-х методів була приблизно однакова, з деякою перевагою центрифугування. Утворену емульсію ліпосом послідовно пропускають через мембрани екструдера з діаметром пор 800, 600, 400 і 200 нм для отримання ліпосом з незначним розподілом розмірів.

Ліпосоми з АТФ, отримані цим способом, підходять для парентерального введення, проте руйнуються в кишечнику при споживанні перорально. Окрім того, концентрація розчину АТФ, яку вводять в ліпосоми, є досить високою, і повинна бути знижена для застосування в харчовому продукті.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки способу отримання ліпосомальної форми АТФ. Поставлена задача вирішується тим, що враховуючи харчове призначення корисної моделі, для виготовлення ліпосом використано соняшниковий лецитин, який є гіпоалергенним. Для підвищення жорсткості ліпосом, лецитин і холестерин змішують в молярному співвідношенні 70:50 відповідно. Для збільшення тривалості перебування ліпосом у кровообігу, використовують поліетиленгліколь у кількості 0,5 моль. Отриману суміш розчиняють в органічному розчиннику і випарюють у вакуумному роторному випарнику до утворення ліпідної плівки. 20 ммоль/л розчин АТФ додають до ліпідної плівки і піддають гідратації протягом 30 хв при температурі 40 °С, періодично помішуючи. Для утворення жорсткіших ліпосом, було збільшено кількість циклів заморожування-танення з 5-ти (за методикою аналога) до 10-ти. Заморожування здійснюють при температурі -80 °С, танення - на водяній бані при температурі +30 °С. Відділення ліпосом від невключеного розчину АТФ здійснюють методом центрифугування.

Для забезпечення тривалого зберігання, а також для зручності подальшого використання, ліпосоми заморожують та піддають ліофільному висушуванню.

Результати досліджень свідчать про те, що ліпосоми, виготовлені цим способом, мають більш жорстку оболонку, тому не руйнуються у кишечнику, а отже можуть використовуватись для виробництва харчових продуктів.

Приклад

На лабораторних вагах з точністю до 0,001 г зважуємо 0,426 г лецитину, 0,176 г холестерину та 0,007 г поліетиленгліколю. Всі вищевказані компоненти поміщають в колбу роторного випарювана, додають 2-3 мл органічного розчинника і перемішують до повного розчинення. Розчин випарюють на вакуумному роторному випарювані до утворення ліпідної плівки на стінках колби. Готують 1 % розчин АТФ, шляхом розведення 0,03 г динатрію аденозин-5'-трифосфату в 3 мл дистильованої води. Розчин АТФ додають в колбу з ліпідною плівкою, закупорюють та поміщають в змішувач на 30 хв при температурі 40 °С. Емульсію, що утворилась, заморожують в морозильній камері при температурі -80 °С. Танення проводять на водяній бані при температурі +30 °С до повного переходу емульсії в рідкий стан. Цикл замороження - танення повторюють ще 9 разів. Не включені в ліпосоми речовини відділяють шляхом центрифугування протягом 20 хв при 10 000 g і температурі +15 °С. Після цього їх ще раз заморожують і піддають ліофільному висушуванню.

Джерела інформації:

1. Arakawa A. Preporation of liposome-encapsulationg adenosine triphosphate / A. Arakawa, S. Ishiguro, K. Ohki, M. Tamai// Tohoku J. Exp.Med.-1998. - P.39-47.

2. Liang W. Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure/ W. Liang, T. S. Levchenko, V.P. Torchilin// Journal of Microencapsulation.-2004. - P.251-261.

3. Verma D. Adenosine Triphosphate-Loaded Liposomes for Myocardium Preservation Under Ischemic Conditions/ D. Verma, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin// Liposome Technology. Third Edition. - New York, 2007.-434 p.

4. Han YY. Liposomal ATP or NAD ρ protects human endothelial cells from energy failure in a cell culture model of sepsis/ Han YY, Huang L, Jackson EK// Res Commun Mol Pathol Pharmacol.-2001. - P. 15-25.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5'-трифосфату (АТФ) для перорального застосування, шляхом розчинення суміші лецитину, холестерину і поліетиленгліколю в органічному розчиннику, з наступним випарюванням до утворення ліпідної плівки, додаванням розчину АТФ, заморожуванням при -80 °С і таненням при температурі +30 °С, а також відділенням невключених в ліпосоми речовин за допомогою центрифугування, який **відрізняється** тим, що в суміші використовують соняшниковий лецитин, холестерин та поліетиленгліколь у молярному співвідношенні 70:50:0,5 відповідно, здійснюють 10-кратне повторювання циклу заморожування-танення, для забезпечення утворення більш жорстких ліпосом, і ліофільно висушують отримані ліпосоми з АТФ.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

3.2. Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми куркуміну

УДК 547.953:615.012:665.372 **doi 10.15407/biotech7.05.055**

СТВОРЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ КУРКУМІНУ

С. М. Шульга ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ
E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 24.06.2014

Досліджено умови створення ліпосомальної форми куркуміну (диферулоїлметану). Наведено методи одержання та визначення розмірів ліпосом і відсоткового вмісту куркуміну в ліпосомах. Фосфоліпіди сої, яєчного жовтка і соняшнику було обрано для приготування «порожніх» ліпосом, а також ліпосом, навантажених куркуміном: C-SPCL (куркумін, інкапсульований у ліпосоми із фосфоліпідів сої), C-EPCL (із фосфоліпідів яєчного жовтка) і C-SFPCL (із фосфоліпідів соняшнику). Досліджено фізичні властивості різних ліпосом, зокрема встановлено середні розміри D_l та ефективність інкапсуляції ЕЕ. За допомогою фотонної кореляційної спектроскопії визначено середні розміри трьох типів ліпосом з інкапсульованим куркуміном: $D_l = 111 \pm 3$ нм для C-SPCL, $D_l = 98 \pm 5$ нм для C-EPCL і $D_l = 109 \pm 5$ нм для C-SFPCL. Значення ефективності інкапсуляції: $EE_{C\text{-}SPC\text{-}L} = 83 \pm 4\%$, $EE_{C\text{-}EPC\text{-}L} = 82 \pm 3\%$ і $EE_{C\text{-}SFPC\text{-}L} = 85 \pm 4\%$.

У результаті проведених досліджень встановлено, що з використанням методів заморожування-танення або сонікації можна виділити ліпосоми з розмірами в діапазоні 100–120 нм. Одержана ліпосомальна форма куркуміну є стабільною, а спосіб заморожування-танення оптимальний для ліпосомальної форми і забезпечує відносно високий (більше 80%) рівень включення куркуміну.

Ключові слова: куркумін, ліпосоми, інкапсуляція.

В останні роки швидкими темпами розвиваються наномедицина і нанофармація, які привертають увагу не тільки науковими досягненнями, але й соціальною значущістю. Однією з основних галузей застосування нанотехнології у медицині та фармакології є наносистеми доставлення лікарських засобів до органів і тканин організму.

Ефективність багатьох біологічно активних сполук обмежена їх поганою розчинністю, нездатністю перетнути мембранні бар'єри, широким спектром першого етапу метаболізму і швидким виведенням з організму. Одним із перспективних способів підвищення ефективності лікарських засобів є створення систем доставлення на основі наноносіїв, зокрема ліпосом. Переваги ліпосом як носіїв ліків очевидні: одержані з природних фосфоліпідів, вони, порівняно з полімерними системами доставлення, повністю біодеградують і є біосумісними, до них можна інкапсулювати багато фармакологічних агентів, зокрема ензимів, гормонів, антибіотиків, імуномодуляторів та антиоксидантів. Окрім того, однією з позитивних властивостей ліпосом як транспортної системи є фармакологічна активність самих фосфоліпідів, з яких сформовано ліпосоми. Відомі лікарські препарати на основі фосфоліпідів для лікування гепатиту, цирозу, токсичних уражень печінки: есенціале (Німеччина), фосфогліф (РФ), ліпін (Україна). У літературі є окремі повідомлення стосовно протизапальної та антиексудативної дії фосфоліпідів. Зазначені властивості дають підстави для прогнозування значних переваг ліпосомальних форм лікарських препаратів порівняно з класичними (таблетованими, капсульованими, мазями та гелями). У зв'язку із цим розроблення ліпосомальної форми куркуміну є досить актуальним.

Куркумін є компонентом куркуми, який одержують шляхом подрібнення висушених кореневищ *Curcuma longa* — рослини із сімейства *Zingiberaceae*. *Curcuma longa* росте в природних умовах в Індії та інших країнах Південно-Східної Азії. Куркуму використовують протягом століть в аюрведичній медицині для лікування респіраторних захворювань, астми, алергії, лихоманки, дерматозів, таких як псоріаз, а також як дієтичний продукт, консервант і барвник у харчовій промисловості [1].

В останні роки інтенсивні дослідження *in vitro* й *in vivo* показали, що куркумін виявляє протипухлинну, противірусну, антиоксидантну та протизапальну властивості [1–4]. Куркумін активно досліджують

як потенційний терапевтичний агент для профілактики та лікування різних патологічних станів і хвороб, зокрема раку, атеросклерозу, нейродегенерації та автоімунних захворювань. В експериментах *in vitro* на культурах клітин куркумін здатен спричинювати апоптоз ракових клітин без цитотоксичного впливу на здорові клітини [5, 6].

Спиртові екстракти куркуми містять близько 3–5% куркуміноїдів (curcuminoids) і до 5% ефірних олій і смол. Було виділено й ідентифіковано близько 10 компонентів куркуми [1, 2], із них найповніше досліджено основні куркуміноїди — куркумін (curcumin) — куркумін I, диметоксикуркумін (demethoxycurcumin) — куркумін II і бісдиметоксикуркумін (*bis*demethoxycurcumin) — куркумін III. Їхні структурні формули та кетоенольні таутомерні (keto-enol tautomers) форми подано на рис. 1.

Куркумін I ідентифіковано як 1,7-біс-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-гепта-1,6-дієн-3,5-діон або диферулоїлметан, який не розчиняється у воді й ефірі, але розчинний в етанолі та ацетоні; температура плавлення 183 °C, молекулярна формула $C_{21}H_{20}O_6$, молекулярна маса — 368 г/моль. Куркумін II — як 1-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-7-(4-гідроксифеніл)-гепта-1,6-дієн-3,5-діон; молекулярна формула $C_{20}H_{18}O_5$, молекулярна маса — 338 г/моль. Куркумін III — як 1,7-біс-(4-гідроксифеніл)-гепта-1,6-дієн-3,5-діон; молекулярна формула $C_{19}H_{16}O_4$, молекулярна маса — 308 г/моль.

Комерційно доступний куркумін — це суміш куркуміну I (77%), куркуміну II (18%) та куркуміну III (5%).

Куркумін, як й інші гідрофільні аніони, не може потрапити до клітини через плазматичну мембрану. Вищезазначені фактори не дають змоги використовувати куркумін без належного захисту за перорального застосування [7, 8]. З метою пошуку альтернативного способу захисту від руйнування за перорального застосування куркуміну було досліджено його ліпосомальні форми. Широкі можливості застосування ліпосом (замкнених везикул, оточених одним або декількома шарами ліпідів) зумовлені сукупністю їхніх біологічних властивостей: хімічною інертністю, біосумісністю і нетоксичністю [9]. Ліпосоми здатні цілеспрямовано (таргетно) доставляти біологічно активні речовини в органи і тканини організму.

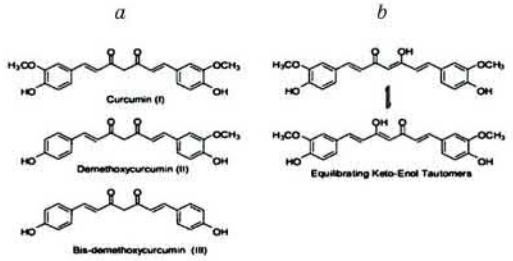


Рис. 1. **Структурні формули куркуміноїдів (*a*) та їхні таутомерні форми (*b*)**

Наразі перспективними галузями використання ліпосом є фармакологія, медицина та харчова промисловість. Їх також застосовують у генній терапії як вектори.

У низці досліджень продемонстровано ефективність ліпосомальної форми куркуміну. Зокрема, доведено позитивний ефект застосування ліпосомальної форми куркуміну для зменшення активності ракових клітин на моделі клітинної культури захворювання товстої кишки [10]. Встановлено [11], що використання ліпосомальної форми куркуміну дає змогу зменшити активність ракових клітин при гінекологічних захворюваннях. Ліпосомальну форму куркуміну активно досліджують і застосовують у разі остеосаркоми [12].

У вищезазначених роботах ліпосомальні форми куркуміну вводили парентерально. Для перорального застосування потрібно створити стабільну ліпосомальну форму куркуміну, яка не руйнується в шлунково-кишковому тракті.

Мета роботи полягала у виборі оптимального способу виділення стабільної ліпосомальної форми куркуміну і забезпечення високого рівня його інкапсуляції.

Матеріали і методи

Виділення ліпосомальної форми куркуміну здійснювали з використанням методу заморожування-танення [13], що ґрунтується на включенні куркуміну (Sami Labs Limited, Karnataka) в ліпосоми, та методу ультразвукової гомогенізації (сонікації) [14]. Для виділення кожного виду ліпосом брали: 1) фосфоліпіди яєчного жовтка (EPC, Fluka); 2) суміш знежиреного лецитину соняшнику (SFPC); 3) суміш знежиреного лецитину сої (SPC), останні — ВАТ «НВЦ Дніпротехнології» (Україна) та холестеролу (Sigma-Aldrich) і поліетиленгліколю (A.C.E.F., S.p.A.) у масовому співвідношенні 3,65:1:0,04.

Метод заморожування-танення. Підготовлену суміш розчиняли в органічному розчиннику та випарювали в ротаційному

випарнику (RE 3000A, ULAB) до утворення ліпідної плівки. Процес гідролізу ліпідної плівки проводили за температури 40 °С розчином куркуміну протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів заморожування-танення. Заморожування проводили за температури −80 °С, танення — на водяній бані за температури +30 °С. Розчин куркуміну, що не ввійшов у ліпосоми, відділяли центрифугуванням та аналізували кількісно за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Метод ультразвукової сонікації. Для повного переведення сухого лецитину в розчинений стан наважку 80 мг лецитину розчиняли в хлороформі (Sigma-Aldrich), загальний об'єм розчину становив 5 мл (16 мг/мл). Випарювання проводили на ротаційному випарнику за 55 °С. Після цього в колбу додавали 5 мл буферу 0,1 М трис-HCl (pH 7,4), інтенсивно змиваючи плівку. Плівка, одержана в результаті випарювання фосфоліпідів яєчного жовтка і фосфоліпідів соняшнику, змивається повністю в середньому за 10 хв, диспергуючись у буферному середовищі. При цьому із фосфоліпідів сої вона змивається погано, і після 30 хв інтенсивного змивання залишаються певні нерозчинні компоненти, які міцно тримаються на стінці колби. Далі розчин піддавали сонікації упродовж 15 хв з розміщенням склянки на льодовій бані. Для сонікації використовували ультразвуковий гомогенізатор (Techpan UD-20) із частотою 22 ± 0,165 кГц. Сонікацію проводили в хімічній склянці на 50 мл; висота рівня рідини становила 6–7 мм; наконечник дезінтегратора занурювали на глибину 2–3 мм від дна і весь час контролювали глибину занурення. Осадження багатошарових ліпосом та інших побічних фрагментів здійснювали в настільній центрифузі Т-51 (2 000 g) протягом 4 хв. Буфер, що його використовували в дослідженнях: 100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 доводили 1 M NaOH.

Вміст включеного в ліпосоми куркуміну визначали за допомогою ВЕРХ (Dionex Ultimate 3000, колонка Discovery C18 250×4,6 мм, 5 мкм, Supelco, США), аналіз проводили в ізократичних умовах, рухома фаза — суміш 0,1 моль буферу KH_2PO_4 і метанолу у співвідношенні 96:4 v/v за швидкості потоку 1 мл/хв, λ = 254 нм [13, 15, 16]. Ефективність включення куркуміну в ліпосоми розраховували за формулою:

$$EE = \frac{Mc}{M} \times 100\% \quad ,$$

де Mc — кількість інкапсульованого куркуміну, M — загальна кількість куркуміну.

Розмір ліпосом визначали за допомогою динамічного світлорозсіювання, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр Zetasizer Nano ZS (ZS ZEN3600, Malvern Instruments) [17] і за допомогою атомно-силового сканувального мікроскопа SOLVER PRO M (NT MDT, Росія)

Лазерний фотонкореляційний спектрометр дає змогу визначити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині шляхом аналізу характерного часу флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від суспензії ліпосомальної форми куркуміну, здійснювали за 25 °С під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Результати розподілу за розмірами в одиницях інтенсивності та кількісному вимірі було одержано з аналізу кореляційної функції з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення Zetasizer Software 6.20.

За допомогою сканувально-зондового мікроскопа досліджено морфологію «порожніх» ліпосом і ліпосом з інкапсульованим куркуміном. Режим сканування — напівконтактний, тип зонда — магнітний кобальтовий (NSG01/Co), маска сканування 95×95 мкм. Як підкладку використовували предметне скло, на яке наносили ліпосоми у буфері. Після процесу сканування АСМ-зображення піддавали статистичній обробці за допомогою вбудованих функцій програми NOVA, яка є стандартним комп'ютерним забезпеченням сканувального зондового мікроскопа SOLVER PRO-M. Розмір ліпосом визначали за координатою z, похибка приладу 1 нм.

Статистичну обробку результатів проводили, розраховуючи середні величини, їхні середньоквадратичні відхилення та похибки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично достовірними за $P < 0{,}05$ [18].

Результати та обговорення

Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла й інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок в розчинах і за рівнянням Стокса встановити розподіл наночастинок за розміром. З огляду на те, що система є динамічною і розміри та форма

частинок змінюються, вимірювання повторювали 4 рази з усередненням результату. За результатами проведених досліджень було встановлено, що ліпосомальна форма куркуміну є стабільною.

Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах 30–1 000 нм, хоча розміри переважної більшості з них (W за кількістю = 91%) — в діапазоні від 50 до 150 нм (рис. 2, *а*, *б*) і лише незначна кількість (W за кількістю = 9%,) мали розміри, що перевищують 200 нм.

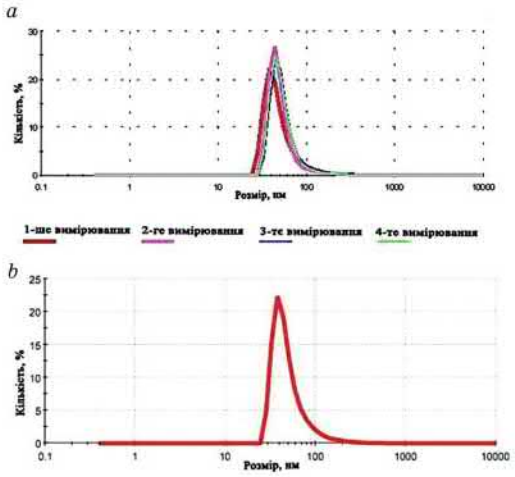


Рис. 2. **Розподіл ліпосомальної форми куркуміну в розчині:**
а — чотири індивідуальних повторення;
б — усереднений результат чотирьох вимірювань

Проте розміри останніх настільки великі, що їхня інтегральна інтенсивність розсіювання (W за інтенсивністю = 93%) значно перевищує цей показник для всіх ліпосом, менших за 100 нм (W за інтенсивністю = 7%).

Одержані дані можуть свідчити про наявність у досліджуваному зразку мультиламілярних ліпосом (складаються з багатьох ліпідних бішарів, розділених водними фазами, і мають великі розміри).

Аналіз ліпосом показав, що розміри порожніх ліпосом, виділених методом заморожування-танення, були в діапазоні від 100,58 ± 4,23 нм до 114,15 ± 3,64 нм (таблиця), а методом сонікації (в дужках) — у діапазоні від 103,58 ± 4,59 нм до 117,57 ± 3,78. Розміри ліпосом з інкапсульованим куркуміном, виділених методом заморожування-танення, були в діапазоні від 98,13 ± 4,80 нм до 111,37 ± 3,13 нм, а методом сонікації (в дужках) — у діапазоні від 101,07 ± 4,11 нм до 114,71 ± 3,48.

Розмір ліпосом є вкрай важливим з погляду їх застосування у медицині. Зменшення розміру везикул збільшує ефективність інкапсульованих зразків. Окрім того, не було істотної різниці в розмірах частинок між C-SPCL і C-SFPCL, тимчасом як розмір везикул C-EPCL був трохи менший, ніж у двох інших типів ліпосом. Індекс полідисперсності (PDI) везикул, інкапсульованих куркуміном, мав значення від 0,255 ± 0,026 до 0,260 ± 0,014, що свідчить про однорідність груп (PDI < 0,3) (таблиця). Що стосується Z-потенціалу, то всі везикули мали негативний заряд поверхні від −10,78 ± 2,07 до −12,91 ± 1,32 мВ. Наночастинки можуть утворювати стабільну дисперсію, коли абсолютне значення Z-потенціалу перевищує 30 мВ. Незважаючи на те, що величини Z-потенціалу цих ліпосом були менше 30 мВ, результати дослідження їхньої стабільності показали, що ліпосоми залишалися стабільними за 4 °C упродовж двох місяців зберігання.

Метод АСМ було використано для вивчення морфології везикул. За результатами морфологічного аналізу всі види везикул мають сферичну або овальну форму (рис. 3–5).

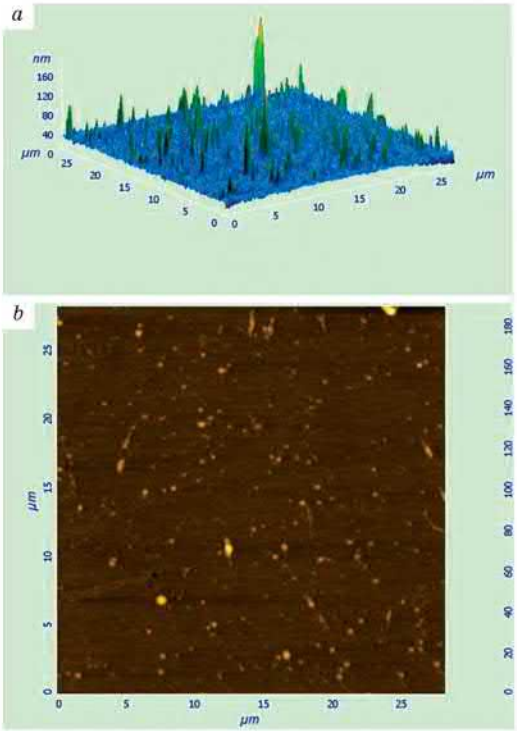


Рис. 3. **Вигляд ліпосом із фосфоліпідів яєчного жовтка:**
а — 3D-формат; *b* — на площині

Характеристики ліпосом різного складу

Склад	Розмір (нм)	Індекс полідисперсності	Z-потенціал (mV)	EE (%, w/w)
CSPCL	111,37 ± 3,13 (114,71 ± 3,48)	0,255 ± 0,026	−12,91 ± 1,32	83,24 ± 3,61 (82,34 ± 3,86)
CEPCL	98,13 ± 4,80 (101,07 ± 4,11)	0,260 ± 0,014	−11,84 ± 1,89	82,47 ± 2,98 (81,79 ± 2,65)
CSFPCL	109,42 ± 4,56 (112,70 ± 4,67)	0,276 ± 0,031	−10,78 ± 2,07	84,75 ± 3,98 (83,67 ± 4,12)
SPC	114,15 ± 3,64 (117,57 ± 3,78)	0,247 ± 0,029	−12,89 ± 1,38	–
EPC	100,58 ± 4,23 (103,58 ± 4,59)	0,261 ± 0,031	−11,91 ± 1,64	–
SFPC	112,16 ± 4,63 (115,52 ± 4,83)	0,279 ± 0,033	−1,91 ± 2,32	–

Примітка: усі результати є достовірними ($P < 0,05$).

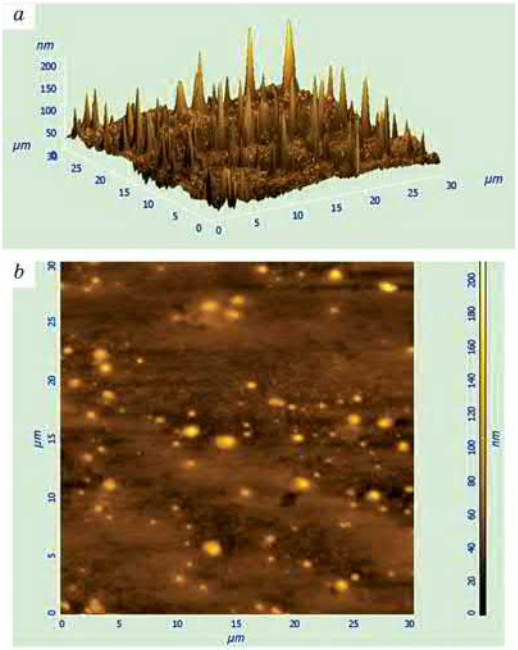


Рис. 4. **Вигляд ліпосом із фосфоліпідів сої:**
a — 3D-формат; *b* — на площині

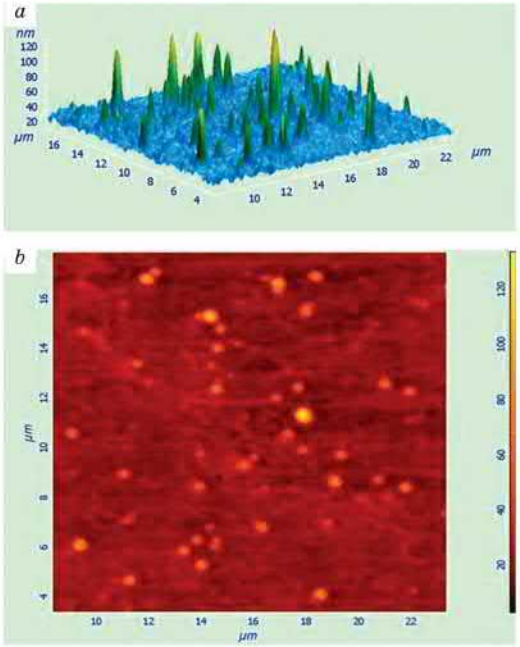


Рис. 5. **Вигляд ліпосом з фосфоліпідів соняшника:**
a — на 3D-форматі; *b* – на площині

Овальна форма може бути результатом деформацій, що виникають під час підготовки зразка. Крім того, методом АСМ не було виявлено структурних відмінностей між цими типами ліпосом.

Ефективність включення куркуміну (ЕЕ) у ліпосоми визначали методом ВЕРХ. Як показано в таблиці, значення ЕЕ цих ліпосом коливалось від 82,47 ± 2,98% до 84,75 ± 3,98%, тобто не було істотної розбіжності в ефективності інкапсуляції куркуміну.

Після статистичної обробки даних кількість куркуміну, включеного в ліпосоми, з вірогідністю $P = 0,95$ становила 83,49 ± 3,52%. Результати свідчать про відносно високий рівень включення цієї речовини.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що з використанням методів заморожування-танення або сонікації можна виділити ліпосоми з розмірами

в діапазоні 100–120 нм. Ліпосомальна форма куркуміну є стабільною, а метод заморожування-танення оптимальний для виділення ліпосомальної форми і забезпечує відносно високий рівень (більше 80%) включення куркуміну.

REFERENCES

1. *Alexios S. Strimpacos, Ricky A. Sharma.* Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antiox. Redox Signal.* 2008, 3(10), 511–545.
2. *Preetha Anand, Sherin G. Thomas, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Chitra Sundaram, Kuzhuvelil B. Harikumar, Bokyung Sung, Sheeja T. Tharakan, Krishna Misra, Indira K. Priyadarsini, Kallikat N. Rajasekharan, Bharat B. Aggarwal.* Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* 2008, V. 76, P. 1590–1611.
3. *Mehmet H. Ucisik, Seta Küpcü, Bernhard Schuster, Uwe B. Sleytr.* Characterization of CurcuEmulsomes: nanoformulation for enhanced solubility and delivery of curcumin. *J. Nanobiotechnol.* 2013, V. 11, P. 1–13.
4. *Ronita De, Parag Kundu, Snehasikta Swarnakar, T. Ramamurthy, Abhijit Chowdhury, G. Balakrish Nair, Asish K. Mukhopadhyay.* Antimicrobial Activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* Isolates from India and during Insection in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 4(53), 1592–1597.
5. *Claire M. Mach, Lata Mathew, Scott A. Mosley, Razelle Kurzrock, Judith A. Smith.* Determination of Minimum Effective Dose and Optimal Dosing Schedule for Liposomal Curcumin in a Xenograft Human Pancreatic Cancer Model. *Anticancer Res.* 2009, V. 29, P. 1895–1900.
6. *Songyot Anuchapreeda, Yoshinobu Fukumori, Siriporn Okonogi, Hideki Ichikawa.* Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. *J. Nanotechnol.* 2012, P. 1–11.
7. *Takuro Kurita, Yuji Makino.* Novel Curcumin Oral Delivery Systems. *Anticancer Res.* 2013, V. 33, P. 2807–2822.
8. *Zhou H., Beevers C. S., Huang S.* The targets of curcumin. *Curr. Drug Targets.* 2011, 12 (3), 332–347.
9. *Shulga S. M.* Liposomes and nanosomes: structure, properties, production. *Biotechnologia Acta.* 2013, 5(6), 19–40.
10. *Maria Pandelidou, Konstantinos Dimas, Aristidis Georgopoulos, Sophia Hatziantiniou, Costas Demetzos.* Preparation and Characterization of Lyophilised EGG PC Liposomes Incorporating Curcumin and Evaluation of Its Activity Against Colorectal Cancer Cell Lines. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2011, V. 11, P. 1259–1266.
11. *Haider Hussain.* Development of liposomal curcumin for vaginal drug delivery. *Thesis for the degree Master of Pharmacy, University of Troms.* 2010, 73 p.
12. *Santosh S. Dhule, Patrice Penfornis, Trivia Frazier, Ryan Walker, Joshua Feldman, Grace Tan, Jibao He, Alina Alb, Vijay John, Radhika Pochampally.* Curcumin-loaded γ-cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 2012, V. 8, P. 440–451.
13. *Khrobatenko O. V., Prytulska N. V., Shulga S. M.* Creating and investigation of adenosine-5-triphosphate liposomal forms for oral applying. *Biotechnologia Acta.* 2013, 3(6), 110–115.
14. *Li W., Wang S., Feng J., Xiao Y., Xue X., Zhang H., Wang Y., Liang X.* Structure elucidation and NMR assignments forcurcuminoids from the rhizomes of *Curcuma longa*. *Magn. Reson Chem.* 2009, 47(10), 902–908.
15. *Hua-shan Shi, Xiang Gao, Dan Li, Qiong-wen Zhang, Yong-sheng Wang, Yu Zheng, Lu-Lu Cai, Ren-ming Zhong, Ao Rui, Zhi-yong Li, Hao Zheng, Xian-cheng Chen, Li-juan Chen.* A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. *Int. J. Nanomed.* 2012, V. 7, P. 2601–2611.
16. *Yan Chen, Qingqing Wu, Zhenghai Zhang, Ling Yuan, Xuan Liu, Lei Zhou.* Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. *Molecules.* 2012, V. 17, P. 5972–5987.
17. The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes [*Electronic resource*] — www.malvern.co.uk.
18. *Gubler E. V., Genkin A. A.* Nonparametric yardstick of statistics using in biomedical research. *Leningrad: Medicina.* 1973, 144 p. (In Russian).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КУРКУМИНА

С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail:shulga5@i.ua

Исследованы условия создания липосомальной формы куркумина (диферулоилметана). Приведены методы получения и определения размеров полученных липосом, процентного содержания куркумина в липосомах. Фосфолипиды сои, яичного желтка и подсолнечника были выбраны для приготовления «пустых» липосом, а также липосом, нагруженных куркумином: C-SPC-L (куркумин, инкапсулированный в липосомы из фосфолипидов сои), C-EPC-L (из фосфолипидов яичного желтка) и C-SFPC-L (из фосфолипидов подсолнечника). Исследованы физические свойства различных липосом: средние размеры D_l и эффективность инкапсуляции EE. С помощью фотонной корреляционной спектроскопии определены средние размеры трех типов липосом с инкапсулированным куркумином D_l = 111 ± 3 нм для C-SPC-L, D_l = 98 ± 5 нм для C-EPC-L и D_l = 109 ± 5 нм для C-SFPC-L. Значение эффективности инкапсуляции: $EE_{C\text{-}SPC\text{-}L}$ = 83 ± 4%, $EE_{C\text{-}EPC\text{-}L}$ = 82 ± 3% и $EE_{C\text{-}SFPC\text{-}L}$ = 85 ± 4% .

В результате проведенных исследований установлено, что при использовании методов замораживания-оттаивания или соникации можно выделить липосомы с размерами в диапазоне 100–120 нм. Полученная липосомальная форма куркумина стабильна, а способ замораживания-оттаивания является оптимальным для липосомальной формы и обеспечивает относительно высокий (более 80%) уровень включения куркумина.

Ключевые слова: куркумин, липосомы, инкапсуляция.

OBTAINING AND CHARACTERISTIC OF CURCUMIN LIPOSOMAL FORM

S. M. Shulga

State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail:shulga5@i.ua

Creation of liposomal forms of curcumin (diferuloilmethane) was investegated in the work. The methods of preparation and determination of the obtained liposomes sizes and percentage of curcumin in liposomes are given. Soybean phospholipids, egg yolk phospholipids and sunflower phospholipids were selected for preparation of "empty" liposomes and liposomes loaded curcumin: C-SPC-L (curcumin encapsulated in SPC liposomes), C-EPC-L (curcumin encapsulated in EPC liposomes) and C-SFPC-L (curcumin encapsulated in liposomes SFPC). Physical properties of different liposomes such as average size (D_l) and encapsulation efficiency (EE) were studed. Using photon correlation spectroscopy, the average size of three types of curcumin-loaded liposomes were found as D_l = 111 ± 3 nm for C-SPC-L, D_l = 98 ± 5 nm for C-EPC-L and D_l = 109 ± 5 nm for C-SFPC-L. Encapsulation efficiency showed the following values: $EE_{C\text{-}SPC\text{-}L}$ = 83 ± 4%, $EE_{C\text{-}EPC\text{-}L}$ = 82 ± 3%, and $EE_{C\text{-}SFPC\text{-}L}$ = 85 ± 4%.

We determined that by using the methods of freezing and thawing or sonication it was possible to isolate liposomes sized in the range 100–120 nm. Upon that the obtained liposomal form of curcumin was stable and freeze-thaw method was optimal for liposomal form and provides a relatively high level (more than 80%) of curcumin inclusion.

Key words: curcumin, liposomes, encapsulation.

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **134981** (13) **U**

(51) МПК (2019.01)
A61K 9/00
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61K 47/00
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)
A61P 31/00
A61P 35/00
A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 00260**
(22) Дата подання заявки: **09.01.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.06.2019**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.06.2019, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):
Шульга Сергій Михайлович (UA),
Глух Ігор Семенович (UA),
Соколик Вікторія Василівна (UA),
Дроздов Олексій Леонідович (UA),
Ємець Алла Іванівна (UA),
Блюм Ярослав Борисович (UA)

(73) Власник(и):
Шульга Сергій Михайлович,
вул. Вишгородська, 47-б, кв. 105, м. Київ, 04114 (UA),
Глух Ігор Семенович,
вул. Артема, 90-д, кв. 11, м. Дніпро, 49000 (UA),
Соколик Вікторія Василівна,
вул. Арх. Альошина, 43/21, кв. 6, м. Харків, 61075 (UA),
Дроздов Олексій Леонідович,
вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, 49027 (UA),
Ємець Алла Іванівна,
вул. Голосіївська, 10, кв. 37, м. Київ, 03039 (UA),
Блюм Ярослав Борисович,
вул. Голосіївська, 10, кв. 37, м. Київ, 03039 (UA)

(74) Представник:
Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280

UA 134981 U

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ КУРКУМІНУ

(57) Реферат:

Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину біологічної активної речовини, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, заморожування за температури -50 °С, танення за +30 °С і відділення невключених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування. Додатково, перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин

фосфоліпідів, холестеролу і поліетиленгликолю як 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну у співвідношенні куркумін:ліпіди 1:(10-15), як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, далі суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої ліпідної плівки. Потім плівку гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Корисна модель належить до медицини та фармацевтики. Характеризується спеціальними фізичними формами, у вигляді ліпосом, з конфігурацією сферичних везикул, з одним або декількома ліпідними бішарами, що утворюються сумішшю фосфоліпідів з водою, з властивостями жирів, олій або восків, як інгредієнтів і носіїв, до використання специфічної терапевтичної активності хімічних з'єднань або лікарських препаратів, з активним інгредієнтом, зокрема, поглиначем вільних радикалів, антиоксидантом, протиінфекційним, протипухлинним, противірусним засобом (наприклад, куркуміном) і може бути використана в медицині, біохімії та фармацевтиці.

Переваги ліпосом як транспортних контейнерів біологічно активних речовин, утворених з природних фосфоліпідів, полягають в прийнятній біосумісності, можливості інкапсулювання різних за природою біологічно активних агентів, універсальних таргетних транспортних властивостях, у біологічній активності їх фосфоліпідів.

Відомі способи отримання ліпосомальних форм лікарських препаратів [1-4], які ґрунтуються на використанні сонікації. Їх основним недоліком є неможливість створення ліпосом заданого розміру і їх недостатня стабільність, що погіршувало б якість ліпосомального куркуміну.

Найближчим аналогом є спосіб отримання ліпосомальної форми лікарського препарату, що включає розчинення суміші фосфоліпідів (лецитину) соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю в органічному розчиннику, додавання розчину біологічної активної речовини, випаровування суміші, з можливістю утворення ліпідної плівки, гідратації, заморожування розчину за температури -50 °С, танення за температури +30 °С і відділення невключених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування, у відповідності з котрим, лецитин соняшнику, холестеріол та поліетиленгліколь змішують у співвідношенні 70:50:0,5, відповідно, додають задану кількість АТФ, як біологічно активну речовину, та кріопротектор, повторюють 10-разово процес заморожування - танення та висушують ліофільним чином [5]. За сукупністю ознак відомий спосіб дозволяє реалізувати прийнятні стабільність і якість ліпосомальної форми препарату, збільшує тривалість її активної фази, забезпечує довготривале зберігання і зручність подальшого використання. Недоліком найближчого аналога є непристосованість технологічних параметрів до виготовлення ліпосомальної форми куркуміну.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалення способу отримання ліпосомальної форми препарату для отримання ліпосомальної форми куркуміну, застосування якого сприяло б поліпшенню інкапсуляції куркуміну, стабільності ліпосом під час зберігання, активації фармакологічної дії біологічної активної речовини шляхом опрацювання режиму розчинення використовуваних сумішей.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання ліпосомальної форми куркуміну, що включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину біологічної активної речовини та кріопротектора, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, заморожування ліпосом за температури -50 °С, танення за температури +30 °С і відділення невключених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування, згідно з корисною моделлю, додатково, перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів, холестеролу і поліетиленгліколю як 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну у співвідношенні куркумін : ліпіди 1 : (10-15), як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, далі суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Новизна способу отримання ліпосомальної форми куркуміну полягає в тому, що перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну, як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Завдяки видаленню вологи та знежиренню лецитину соняшнику, досягають відповідного якісного та кількісного складу суміші фосфоліпідів (фосфатидил-холіну - PC, фосфатидилетаноламіну - PE, фосфатидилінозитолу - PI, лізофосфатидилхоліну - LPC), який

повторює склад фосфоліпідів мембрани клітин, що сприяє поліпшенню фармакологічної активності біологічно активної речовини, зокрема, куркуміну, його інкапсуляції та стабільності ліпосом в основі лікарської форми.

Виділення суміші фосфоліпідів не тільки поліпшує інкапсуляцію, фармакологічну активність куркуміну та стабільність ліпосом під час зберігання, а також сприяє, вбудові фосфоліпідів в мембрани клітин після деградації ліпосом.

Співвідношення масових частин суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, забезпечує отримання ліпосомальної форми куркуміну. Дане співвідношення оптимальне, опрацьоване з урахуванням хіміко-фізичних властивостей куркуміну та залежності ефективності інкапсульованих зразків від розмірів везикул, як важливих технологічних показників процесу отримання ліпосомальної форми куркуміну. Для надання ліпосомам прийнятної жорсткості фосфоліпіди знежиреного лецитину соняшнику і холестерол співвіднесені в пропорції 3,65:1,80, а для збільшення тривалості їх перебування в кровообігу, поліетиленгліколь залучають до них у кількості 0,04 масових частин.

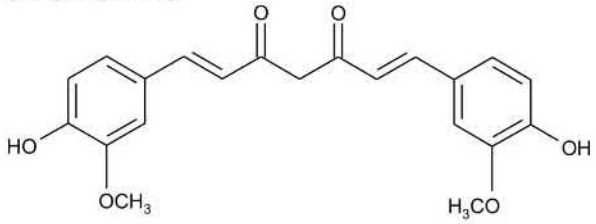
Послідовна екструзія, з використання мембран з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм., відповідно, забезпечує отримання стерильних ліпосомальних форм куркуміну з зовнішним діаметром ліпосом 45-60 нм.

Отримана ліпосомальна форма куркуміну, після проведення послідовної екструзії, характеризується високою інкапсуляцією, активністю фізіологічної речовини та стабільністю ліпосом під час зберігання.

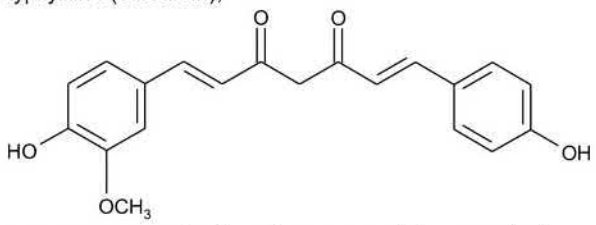
Таким чином, сукупність ознак заявленої корисної моделі є суттєвою і відповідає критерію "новизна", бо має причинно-наслідковий зв'язок з досягненням вищенаведеного технічного результату, в усіх випадках її багаторазового використання.

Властивості способу отримання ліпосомальної форми куркуміну тестували під час експериментальних досліджень.

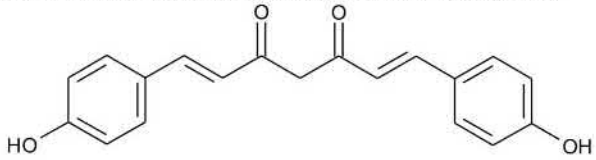
Оскільки куркумін, як і інші гідрофобні аніони не може потрапляти до клітин через плазматичну мембрану, виділяли й ідентифікували близько 10 компонентів куркуми та залучали до здійснення способу найбільш досліджені куркуміноїди, зокрема, куркумін I (curcumin), диметоксикуркумін (demethoxycurcumin) - куркумін II та бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin) - куркумін III, у вигляді суміші куркуміну I (77 %), куркуміну II (18 %) і куркуміну III (решта).



куркумін I (curcumin),



диметоксикуркумін (demethoxycurcumin) - куркумін II,



бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin) - куркумін III.

Тест I. Суміш фосфотидилхоліну яєчного жовтка EPC (Fluka, США) холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену при співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, відповідно, розчиняли і додавали водно-етанольний розчин

куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С протягом 30 хв. Далі здійснювали 10 циклів заморожування-танення (на водяній бані), за температури -50 °С і +30 °С, відповідно. Розчин центрифугували (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматографа.

Тест II. Суміш фосфоліпідів знежиреного лецитину сої (SPL) "НВП Біолер, Україна", холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену у співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, розчиняли, додавали водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С, протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів замороження й танення (на водяній бані), за температури -50 °С і +30 °С, відповідно. Розчин центрифугували (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматогрофа.

Тест III. Суміш фосфоліпідів знежиреного лецитину соняшнику (SFPL) "НВП Біолер, Україна", холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену у співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, розчиняли, додавали водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С, протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів замороження й танення (на водяній бані), за температури -50 °С і +30 °С, відповідно, та послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм. Розчин перед екструзією піддавали центрифугуванню (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматографа.

Вміст не включеного до ліпосом куркуміну визначали за допомогою рідинної хроматографії ("Dionex Ultimate 3000", колонка "Discovery C18" 250×4,6 мм, 5 мкм, "Supelco", США). Оцінку надавали в ізократичних умовах: рухома фаза-суміш 0,1 моль KH_2PO_4 буферу і метанолу, при співвідношенні 96:4; швидкість потоку 1 мл/хв; Детектор UV-VIS, довжина хвилі 254 нм.

Частку куркуміну в ліпосомах розраховували:

$$EE = 100\% - \frac{Mc}{M} \times 100\%,$$

де Mc - кількість неінкапсульованого куркуміну;

M - загальна кількість куркуміну.

Показали, що при утворенні ліпосом вищенаведеним способом (Тест III) у присутності куркуміну, (93±2) % останнього інкапсулюється в ліпосоми.

Розмір ліпосом визначали шляхом світлорозсіювання за допомогою лазерного фотонкореляційного спектрометра "ZETASIZER NANO ZS" (ZS ZEN3600, "Malvern Instruments", Великобританія) та атомно-силового сканувального мікроскопа "SOLVER PRO M" (NT MDT, Росія).

Лазерний фотонкореляційний спектрометр "Zetasizer Nano ZS" дозволив визначити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині шляхом аналізу характерного часу флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від суспензії ліпосомальної форми куркуміну, здійснювали за температурі +25 °С, під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Розподіл розмірів ліпосом визначали за аналізом кореляційної функції, на основі алгоритму "General purpose" (софт "Zetasizer Software" v.6.20).

За допомогою атомно-силового сканувально-зондового мікроскопа "Solver Pro M" була досліджена морфологія ліпосом без куркуміну ("порожніх") і ліпосом з інкапсульованим куркуміном. Режим сканування - напівконтактний, тип зонда - магнітний кобальтовий (NSG01/Co), маска сканування 95×95 мкм. Як підкладку використовували предметне скло, на яке наносили зразки суспензій ліпосом. АСМ-зображення після сканування піддавали статистичній обробці за допомогою програми "NOVA" (стандартне програмне забезпечення мікроскопа "Solver Pro M"). Розмір ліпосом визначали за координатою Z (при похибці приладу ± 1 нм). Статистичну обробку результатів приводили, розраховуючи середні величини, їхні середньоквадратичні відхилення та похибки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично достовірними ($p<0,05$).

Розміри переважної більшості ліпосом виявляли в діапазоні 45-55 нм і лише 7 % від їхньої кількості мало розміри ≥55 нм.

Порівняльний аналіз розмірів "порожніх" ліпосом і ліпосом з куркуміном не визначив статистично значущих відмінностей. Розміри "порожніх" ліпосом створених шляхом екструзії від 45,13±4,23 до 51,37±3,13 нм, а розміри ліпосом з інкапсульованим куркуміном, створені подібним чином - в діапазоні від 50,58±4,64 до 55,15±3,73 нм.

В результаті досліджень встановлено, що шляхом екструзії ліпосоми можна отримувати в діапазоні 45-60 нм. Ліпосомальна форма куркуміну, отримувана при співвідношенні масових частин фосфоліпідів знежиреного лецетину соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, є стабільною, а метод екструзії через мембрани - оптимальним для отримання ліпосомальної форми, з відносно високим рівнем включення куркуміну (≥ 90 %).

Оптимальність співвідношення масових частин фосфоліпідів знежиреного соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю (3,65:1,80:0,04) опрацьовували з урахуванням можливості оптимізації розмірів ліпосом, як важливого технологічного показника процесу отримання ліпосомальної форми куркуміну, враховуючи те, що зменшення розмірів везикул збільшує ефективність інкапсульованих зразків.

Поряд із цим, досліджували когнітивно-протективні, антизапальні властивості отримуваного ліпосомального куркуміну в назальній терапії щурів з моделлю хвороби Альцгеймера.

У інтактних тварин (лабораторні щури) виробляли умовно-рефлекторну реакцію уникання на пред'явлення як умовного сигналу звуку метроному 300 уд/хв, а безумовного підкріплення - електрошкірне больове подразнення напругою до 30 В. Надалі моделювали хворобу Альцгеймера інтрагіпокампальним введенням 10 мкл агрегатів β-амілоїдного пептиду $Aβ_{42}$_Human в дозі 200 мкг/кг маси тіла щура. Через 7 діб після введення агрегатів $Aβ_{42}$ починали назальну терапію ліпосомальною формою куркуміну:інтраназальне введення цього поліфенолу у ліпосомах здійснюють раз на добу в дозі $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Пам'ять щурів оцінювали за допомогою кількісно-якісних показників умовних рефлексів уникання тричі: перед маніпуляціями, на 7 добу після інтрагіпокампального введення агрегатів $Aβ_{42}$ та після 30 діб інтраназального введення ліпосомального куркуміну.

У гіпокампі та неокортексі головного мозку імуноферментним методом вимірювали рівні інтерлейкінів (IL-6, IL-10) і фактора некрозу пухлини альфа (TNFα) в групі контроля (інтактні щури), в групі модель хвороби Альцгеймера (через 7 діб після введення агрегатів $Aβ_{42}$) і в групі лікування (через 30 діб назальної терапії ліпосомальним куркуміном).

Введення агрегатів $Aβ_{42}$ до гіпокампу через 7 діб призводило до погіршення пам'яті щура: зниження на 30 % частки умовно-рефлекторних відповідей на пред'явлення умовно-рефлекторного сигналу, що складало 70 %, проти 100 % показників, які визначалися до введення агрегатів $Aβ_{42}$, та підвищення латентного періоду реалізації умовних рефлексів до 7,2 с проти 5,2 с, що спостерігалося до введення агрегатів β-амілоїдного пептиду.

Поряд із цим, відзначалася активація цитокінової ланки нейрозапалення у відділах головного мозку, що відповідають за пам'ять тварин. Рівень прозапальних цитокінів у гіпокампі складав: TNFα-63,8, проти 50,7 нг/г протеїну в контролі; IL-6 - 72,8, проти 57,3 нг/г протеїну, відповідно. Рівень антизапального цитокіну IL-10 - 254,3, проти 130,4 нг/г протеїну у контролі. В неокортексі рівень прозапальних цитокінів сягав: TNFα - 46,2, проти 50,8 нг/г протеїну в контролі; IL-6 - 80,8, проти 52,5 нг/г протеїну відповідно. Рівень IL-10 - 150,8, проти 179,5нг/г протеїну, відповідно.

Після назальної терапії тварин ліпосомальним куркуміном, наданій в дозі $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси, 1 раз на добу, протягом 30 діб, спостерігали: скорочення латентного періоду умовно-рефлекторних реакцій уникання до 6,2 с, проти 7,2 с, після впливу агрегатами β-амілоїдного пептиду 42; збільшення частки вірних відповідей до 78 %, проти 70 %, відповідно; зниження рівня прозапальних цитокінів у гіпокампі: TNFα - до 28,3, проти 63,8 нг/г протеїну, після введення агрегатів β-амілоїдних пептидів 42; IL-6 - до 44,7, проти 72,8 нг/г проти зниження рівня протизапального IL-10 - до 122,4, проти 254,3 нг/г протеїну, відповідно. В неокортексі виявлено зниження TNFα до 13,2, проти 46,2 нг/г протеїну, після введення агрегатів β-амілоїдних пептидів 42; IL-6 - 26,8, проти 80,8 нг/г протеїну, відповідно, IL-10 - 89,4, проти 150,8 нг/г протеїну, що інформує про специфічне пригнічення цитокінової ланки нейрозапалення у цільових структурах мозку (гіпокампі та неокортексі), після впливу ліпосомальним куркуміном.

Таким чином, назальна терапія за допомогою ліпосомального куркуміну сприяла його активному транспорту у передні відділи головного мозку та викликала пригнічення нейрозапалення у структурах мозку, які відповідають за реалізацію пам'яті.

Відомості, які підтверджують можливість здійснення запропонованого рішення задачі полягають у наступному.

Суть. Для здійснення способу більш доцільним є залучення суміші куркуміноїдів: куркуміну (77 %), диметоксикуркуміну (18 %) і бісдиметоксикуркуміну (решта) або куркуміну виробництва (Sigma-Aldrich, США). Також необхідні холестерол (Sigma-Aldrich, США), поліетиленгліколь (A.C.E.F., S.p.A., Італія), лецитин соняшнику SFPL "НВП БІОЛЕР" (Україна), а також екструдер "Liposo Fast-Basic LF-1" (Avestin, США) з комплектом полікарбонатних мембран LFM-50, 100, 200 з діаметром отворів 50, 100 і 200 нм, відповідно.

Для отримання ліпосомальної форми куркуміну за умов запропонованого способу видаляють вологу і знежирюють лецитин соняшнику, виділяючи фосфоліпіди. Фосфоліпіди знежиреного лецитину соняшнику, холестерол та поліетиленгліколь змішують при співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, відповідно, розчинюють, додають водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношенні 1:(10-15) до фосфоліпідів, та піддають випаровуванню, до утворення сухої ліпідної плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, відділяють речовини, невключені в ліпосоми, за допомогою центрифуги, і здійснюють послідовну екструзію суміші через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Тож, за результатом опрацювання режиму розчинення сумішей фосфоліпідів знежиреного лецетину соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю досягають поліпшення інкапсуляції куркуміну, стабільності ліпосом під час зберігання та активації фармакологічної дії куркуміну.

Запропоноване рішення задачі відповідає умові "промислова придатність", оскільки перевершує досягнення об'єктів минулого покоління, стаючи корисним у виробництві продуктів для медицини, біохімії і фармацевтичної промисловості.

Джерела інформації:

1. Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. Therapy Jorn. of Nanotechnology. 2012, Article ID.

2. Спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин: Пат. 76393 України, МПК: A61K 9/127, A61K 31/353, A61K 47/44, A61P 39/06, A 61P 31/00, A61P 35/00 / Інститут фармакології та токсикології АМН України; Стефанов О.В., Григор'єва Г.С., Соловйов А.І., Пасечнікова Н.В., Конахович Н.Ф., Хромов О.С, Краснопольський Ю.М. (Україна). - № a200604675; заявл. 27.04.2006; опубл. 17.07.2006.

3. Preparation method for curcumin long circulating liposomes: Pat. CN103637988 EP, IntCl: A61K31/12, A61K47/34, A61K9/127, A61P29/00, A61P35/00, A61P 39/06 / Univ zhejiang Chinese medical (CN); Li Fanzhu, You Jia, Wang Guowei, Wei Yinghui, Xu Junjun, Guo Manman (CN). - № CN20131414165; prior. 11. 09.2013; publ. 19.03.2014.

4. Способ получения липосомальной форми кверцетина: Пат. 201201593 ЕПВ, МПК: A61K 31/352, A61K 9/127 / ООО "Технология лекарств" (Россия); Шоболов Д.Л., Ульянов А.М., Тарасов В.В., Балабаньян В.Ю., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. (Россия). - № 201201593; заявл. 24.12.2012; опубл. 29.05.2015.

5. Спосіб отримання ліпосомальної форми АТФ для перорального застосування: Пат. 77865 України, МПК: A23J 7/00, A61K 9/127, A61K 31/7076 / Притульська Н.В., Хробатенко О.В., Шульга С.М. (Україна). - № u201210974; заявл. 20.09.2012; опубл. 25.02.2013.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну, що включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину біологічної активної речовини, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, заморожування за температури -50 °С, танення за +30 °С і відділення невключених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування, який **відрізняється** тим, що додатково, перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів, холестеролу і поліетиленгликолю як 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну у співвідношенні куркумін:ліпіди 1:(10-15), як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, далі суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої ліпідної плівки, потім плівку гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121627** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)
A61K 9/00
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/44 (2017.01)
A61K 47/00
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)
A61P 31/00
A61P 35/00
A61P 31/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 00259**
(22) Дата подання заявки: **09.01.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.06.2020**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.04.2019, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.06.2020, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):
Шульга Сергій Михайлович (UA),
Глух Ігор Семенович (UA),
Соколик Вікторія Василівна (UA),
Дроздов Олексій Леонідович (UA),
Ємець Алла Іванівна (UA),
Блюм Ярослав Борисович (UA)

(73) Власник(и):
Шульга Сергій Михайлович,
вул. Вишгородська, 47-б, кв. 105, м. Київ, 04114 (UA),
Глух Ігор Семенович,
вул. Артема, 90-д, кв. 11, м. Дніпро, 49000 (UA),
Соколик Вікторія Василівна,
вул. Арх. Альошина, 43/21, кв. 6, м. Харків, 61075 (UA),
Дроздов Олексій Леонідович,
вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, 49027 (UA),
Ємець Алла Іванівна,
вул. Голосіївська, 10, кв. 37, м. Київ, 03039 (UA),
Блюм Ярослав Борисович,
вул. Голосіївська, 10, кв. 37, м. Київ, 03039 (UA)

(74) Представник:
Білозуб Володимир Володимирович, реєстр. №280

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 77865 U, 25.02.2013
Шульга С. М. Створення та характеристика ліпосомальної форми куркуміну / С. М. Шульга // Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7. - № 5. – P. 55-61
Применение нанобиотехнологических форм куркумина / Пилипенко Д. М. И др. // Вісник НТУ «ХПІ». – 2018. - № 9 (1285). – С. 218-229
Development of curcumin liposome formulations using polyol dilution method / Lalana Konganermit et al. // Songlanakarin J. Sci. Technol. 38(6). – 2016. – P. 605-610

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ КУРКУМІНУ

(57) Реферат:

UA 121627 C2

Винахід стосується галузі медицини та фармацевтики, а саме одержання ліпосомальної форми куркуміну, що включає розчинення суміші лецитину соняшника, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання куркуміну, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, процес замороження-танення і відділення речовин, не включених в ліпосоми, шляхом центрифугування, причому перед розчиненням лецитин знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів соняшника, холестеролу та поліетиленгликолю 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість розчину куркуміну як біологічно активної речовини, суміш випарюють за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої плівки, плівку гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води та здійснюють послідовну екструзію через мембрани з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Винахід належить до медицини та фармацевтики. Характеризується спеціальними фізичними формами, у вигляді ліпосом, з конфігурацією сферичних везикул, з одним або декількома ліпідними бішарами, що утворюються сумішшю фосфоліпідів з водою, з властивостями жирів, олій або восків, як інгредієнтів і носіїв, до використання специфічної терапевтичної активності хімічних з'єднань або лікарських препаратів, з активним інгредієнтом, зокрема, поглиначем вільних радикалів, антиоксидантом, протиінфекційним, протипухлинним, противірусним засобом (наприклад, куркуміном) і може бути використаний в медицині, біохімії та фармацевтиці.

Переваги ліпосом як транспортних контейнерів біологічно активних речовин, утворених з природних фосфоліпідів, полягають в прийнятній біосумісності, можливості інкапсулювання різних за природою біологічно активних агентів, універсальних таргетних транспортних властивостях, у біологічній активності їх фосфоліпідів.

Відомі способи отримання ліпосомальних форм лікарських препаратів [1-4], які ґрунтуються на використанні сонікації. Їх основним недоліком є неможливість створення ліпосом заданого розміру і їх недостатня стабільність, що погіршувало б якість ліпосомального куркуміну.

Більш наближеним до заявленого винаходу є спосіб отримання ліпосомальної форми лікарського препарату, що включає розчинення суміші фосфоліпідів (лецитину) соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю в органічному розчиннику, додавання розчину біологічної активної речовини, випаровування суміші, з можливістю утворення ліпідної плівки, гідратації, заморожування розчину за температури -50 °С, танення за температури +30 °С і відділення не включених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування, у відповідності з котрим, лецитин соняшнику, холестеріол та поліетиленгліколь змішують у співвідношенні 70:50:0,5, відповідно, додають задану кількість АТФ, як біологічно активну речовину, та кріопротектор, повторюють 10-разово процес заморожування-танення та висушують ліофільним чином [5]. За сукупністю ознак відомий спосіб дозволяє реалізувати прийнятні стабільність і якість ліпосомальної форми препарату, збільшує тривалість її активної фази, забезпечує довготривале зберігання і зручність подальшого використання. Недоліком прототипу є непристосованість технологічних параметрів до виготовлення ліпосомальної форми куркуміну.

До основи винаходу поставлена задача перетворити спосіб отримання ліпосомальної форми АТФ в спосіб отримання ліпосомальної форми куркуміну, застосування якого сприяло б поліпшенню інкапсуляції куркуміну, стабільності ліпосом під час зберігання, активації його фармакологічної дії шляхом опрацювання технологічного режиму розчинення використовуваних сумішей.

Технічний результат при здійсненні винаходу досягається тим, що у способі отримання ліпосомальної форми куркуміну, що включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину біологічної активної речовини та кріопротектора, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, заморожування ліпосом за температури -50 °С, танення за температури +30 °С і відділення не включених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування протягом 5 хвилин (8000 об/хв.), у відповідності з винаходом, додатково, перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів, холестеролу і поліетиленгліколю як 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну у співвідношенні куркумін: ліпіди 1: (10-15), як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, далі суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Новизна способу отримання ліпосомальної форми куркуміну полягає в тому, що, перед розчиненням, лецитин соняшнику знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Завдяки видаленню вологи та знежиренню лецитину соняшнику, досягають відповідного якісного та кількісного складу суміші фосфоліпідів (фосфатидилхоліну - PC, фосфатидилетаноламіну - PE, фосфатидилінозитолу - PI, лізофосфатидилхоліну - LPC), який

повторює склад фосфоліпідів мембрани клітин, що сприяє поліпшенню фармакологічної активності біологічно активної речовини, зокрема, куркуміну, його інкапсуляції та стабільності ліпосом в основі лікарської форми.

Виділення суміші фосфоліпідів не тільки поліпшує інкапсуляцію, фармакологічну активність куркуміну та стабільність ліпосом під час зберігання, а також сприяє вбудові фосфоліпідів в мембрани клітин після деградації ліпосом.

Співвідношення масових частин суміші фосфоліпідів соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, забезпечує отримання ліпосомальної форми куркуміну. Дане співвідношення оптимальне, опрацьоване з урахуванням хіміко-фізичних властивостей куркуміну та залежності ефективності інкапсульованих зразків від розмірів везикул, як важливих технологічних показників процесу отримання ліпосомальної форми куркуміну. Для надання ліпосомам прийнятної жорсткості фосфоліпіди знежиреного лецитину соняшнику і холестерол співвіднесені в пропорції 3,65:1,80, а для збільшення тривалості їх перебування в кровообігу, поліетиленгліколь залучають до них у кількості 0,04 масових частин.

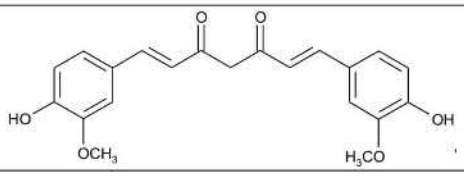
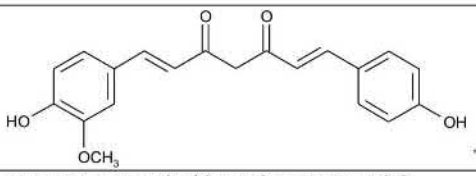
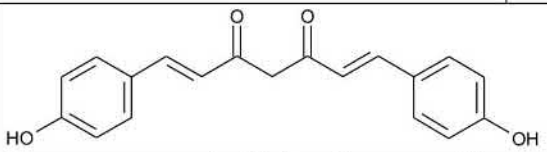
Послідовна екструзія, з використання мембран з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм., відповідно, забезпечує отримання стерильних ліпосомальних форм куркуміну з зовнішнім діаметром ліпосом 45-60 нм.

Отримана ліпосомальна форма куркуміну, після проведення послідовної екструзії, характеризується високою інкапсуляцією, активністю фізіологічної речовини та стабільністю ліпосом під час зберігання.

Таким чином, сукупність ознак заявленого винаходу є суттєвою і відповідає критерію "новизна", бо має причинно-наслідковий зв'язок з досягненням вищенаведеного технічного результату, в усіх випадках її багаторазового використання.

Під час апробації винаходу тестували властивості способу отримання ліпосомальної форми куркуміну.

Оскільки куркумін, як і інші гідрофобні аніони, не може потрапляти до клітин через плазматичну мембрану, виділяли й ідентифікували близько 10 компонентів куркуми та залучали до здійснення способу найбільш досліджені куркуміноїди, зокрема куркумін I (curcumin), диметоксикуркумін (demethoxycurcumin) - куркумін II та бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin) - куркумін III, у вигляді суміші куркуміну I (77 %), куркуміну II (18 %) і куркуміну III (решта).

<table>
<tr><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>куркумін I (curcumin)</td><td>диметоксикуркумін (demethoxycurcumin)
куркумін II</td></tr>
<tr><td colspan="2">  </td></tr>
<tr><td colspan="2">бісдиметоксикуркумін (bisdemethoxycurcumin) - куркумін III</td></tr>
</table>

Тест I. Суміш фосфотидилхоліну яєчного жовтка EPC (Fluka, США) холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену при співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, відповідно, розчиняли і додавали водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С, протягом 30 хв. Далі здійснювали 10 циклів заморожування - танення (на водяній бані), за температури - 50 °С і +30 °С, відповідно. Розчин центрифугували (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматографа.

Тест II. Суміш фосфоліпідів знежиреного лецитину сої (SPL) "НВП Біо-лер, Україна", холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену у співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, розчиняли, додавали водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С, протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів замороження й танення (на водяній бані), за температури -50 °С і +30 °С, відповідно. Розчин центрифугували (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматографа.

Тест III. Суміш фосфоліпідів знежиреного лецитину соняшнику (SFPL) "НВП Біолер, Україна", холестеролу (Sigma-Aldrich, США) і поліетиленгліколю (A.C.E.F.,S.p.A., Італія), підготовлену у співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, розчиняли, додавали водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношення куркумін:ліпіди 1:(10-15) і випаровували в ротаційному випарнику, до утворення сухої ліпідної плівки. Процес гідратації сухої ліпідної плівки з куркуміном відбувався за температури +40 °С, протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів замороження й танення (на водяній бані), за температури -50 °С і +30 °С, відповідно, та послідовну екструзію через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм. Розчин перед екструзією піддавали центрифугуванню (при 8000 об/хв протягом 5 хвилин) і в супернатанті визначали залишкову кількість куркуміну за допомогою рідинного хроматографа.

Вміст не включеного до ліпосом куркуміну визначали за допомогою рідинної хроматографії ("Dionex Ultimate 3000", колонка "Discovery C18" 250 × 4.6 мм, 5 мкм, "Supelco", США). Оцінку надавали в ізократичних умовах: рухома фаза - суміш 0,1 моль KH_2PO_4 буферу і метанолу, при співвідношенні 96:4; швидкість потоку 1 мл/хв; Детектор UV-VIS, довжина хвилі 254 нм.

Долю/частку куркуміну в ліпосомах розраховували:

$$EE = 100\,\% - \frac{M_x}{M} \times 100\,\%,$$

$$EE = 100\,\% - \frac{M_c}{M} \times 100\,\%$$

де M_x - кількість неінкапсульованого куркуміну;

M - загальна кількість куркуміну.

Показали, що при утворенні ліпосом вищенаведеним способом (Тест III) у присутності куркуміну, (93±2)% останнього інкапсулюється в ліпосоми.

Розмір ліпосом визначали шляхом світлорозсіювання за допомогою лазерного фотонкореляційного спектрометра "ZETASIZER NANO ZS" (ZS ZEN3600, "Malvern Instruments", Великобританія) та атомно-силового сканувального мікроскопа "SOLVER PRO M" (NT MDT, Росія).

Лазерний фотонкореляційний спектрометр "Zetasizer Nano ZS" дозволив визначити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині шляхом аналізу характерного часу флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від суспензії ліпосомальної форми куркуміну, здійснювали за температурі +25 °С, під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Розподіл розмірів ліпосом визначали за аналізом кореляційної функції, на основі алгоритму "General purpose" (софт "Zetasizer Software" v.6.20).

За допомогою атомно-силового сканувально-зондового мікроскопа "Solver Pro M" була досліджена морфологія ліпосом без куркуміну ("порожніх") і ліпосом з інкапсульованим куркуміном. Режим сканування - напівконтактний, тип зонда - магнітний кобальтовий (NSG01/Co), маска сканування 95 × 95 мкм. Як підкладку використовували предметне скло, на яке наносили зразки суспензій ліпосом. АСМ-зображення після сканування піддавали статистичній обробці за допомогою програми "NOVA" (стандартне програмне забезпечення мікроскопа "Solver Pro M"). Розмір ліпосом визначали за координатою Z (при похибці приладу ± 1 нм). Статистичну обробку результатів приводили, розраховуючи середні величини, їхні середньоквадратичні відхилення та похибки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми значеннями використовували критерій Стьюдента. Розбіжності вважали статистично достовірними ($p<0,05$).

Розміри переважної більшості ліпосом виявляли в діапазоні 45-55 нм і лише 7 % від їхньої кількості мало розміри ≥55 нм.

Порівняльний аналіз розмірів "порожніх" ліпосом і ліпосом з куркуміном не визначив статистично значущих відмінностей. Розміри "порожніх" ліпосом створених шляхом екструзії від 45,13±4,23 до 51,37±3,13 нм, а розміри ліпосом з інкапсульованим куркуміном, створені подібним чином - в діапазоні від 50,58±4,64 до 55,15±3,73 нм.

В результаті досліджень встановлено, що шляхом екструзії ліпосоми можна отримувати в діапазоні 45-60 нм. Ліпосомальна форма куркуміну, отримувана при співвідношенні масових частин фосфоліпідів знежиреного лецетину соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю 3,65:1,80:0,04, відповідно, є стабільною, а метод екструзії через мембрани - оптимальним для отримання ліпосомальної форми, з відносно високим рівнем включення куркуміну (≥90 %).

Оптимальність співвідношення масових частин фосфоліпідів знежиреного соняшнику, холестеролу і поліетиленгліколю (3,65:1,80:0,04) опрацьовували з урахуванням можливості оптимізації розмірів ліпосом, як важливого технологічного показника процесу отримання ліпосомальної форми куркуміну, враховуючи те, що зменшення розмірів везикул збільшує ефективність інкапсульованих зразків.

Поряд із цим, досліджували когнітивно-протективні, антизапальні властивості отримуваного ліпосомального куркуміну в назальній терапії щурів з моделлю хвороби Альцгеймера.

У інтактних тварин (лабораторні щури) виробляли умовно-рефлекторну реакцію уникання на пред'явлення в якості умовного сигналу звуку метроному 300 уд/хв, а безумовного підкріплення - електрошкірне больове подразнення напругою до 30 В. Надалі моделювали хворобу Альцгеймера інтрагіпокампальним введенням 10 мкл агрегатів β-амілоїдного пептиду $A\beta_{42}$_Human в дозі 200 мкг/кг маси тіла щура. Через 7 діб після введення агрегатів $A\beta_{42}$ починали назальну терапію ліпосомальною формою куркуміну: інтраназальне введення цього поліфенолу у ліпосомах здійснюють раз на добу в дозі $12,0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Пам'ять щурів оцінювали за допомогою кількісно-якісних показників умовних рефлексів уникання тричі: перед маніпуляціями, на 7 добу після інтрагіпокампального введення агрегатів $A\beta_{42}$ та після 30 діб інтраназального введення ліпосомального куркуміну.

У гіпокампі та неокортексі головного мозку імуноферментним методом вимірювали рівні інтерлейкінів (IL-6, IL-10) і фактору некрозу пухлини альфа (TNFα) в групі контролю (інтактні щури), в групі модель хвороби Альцгеймера (через 7 діб після введення агрегатів $A\beta_{42}$) і в групі лікування (через 30 діб назальної терапії ліпосомальним куркуміном).

Введення агрегатів $A\beta_{42}$ до гіпокампу через 7 діб призводило до погіршення пам'яті щура: зниження на 30 % частки умовно-рефлекторних відповідей на пред'явлення умовно-рефлекторного сигналу, що складало 70 %, проти 100 % показників, які визначалися до введення агрегатів $A\beta_{42}$, та підвищення латентного періоду реалізації умовних рефлексів до 7,2 с проти 5,2 с, що спостерігалося до введення агрегатів β-амілоїдного пептиду.

Поряд із цим, відзначалася активація цитокінової ланки нейрозапалення у відділах головного мозку, що відповідають за пам'ять тварин. Рівень прозапальних цитокінів у гіпокампі складав: TNFα - 63,8, проти 50,7 нг/г протеїну в контролі; IL-6-72,8, проти 57,3 нг/г протеїну, відповідно. Рівень антизапального цитокіну IL-10-254,3, проти 130,4 нг/г протеїну у контролі. В неокортексі рівень проза-пальних цитокінів сягав: TNFα - 46,2, проти 50,8 нг/г протеїну в контролі; IL-6-80,8, проти 52,5 нг/г протеїну відповідно. Рівень IL-10-150,8, проти 179,5 нг/г протеїну, відповідно.

Після назальної терапії тварин ліпосомальним куркуміном, наданій в дозі $12,0\times10^{-6}$ г/кг маси, 1 раз на добу, протягом 30 діб, спостерігали: скорочення латентного періоду умовно-рефлекторних реакцій уникання до 6,2 с, проти 7,2 с, після впливу агрегатами β-амілоїдного пептиду 42; збільшення частки вірних відповідей до 78 %, проти 70 %, відповідно; зниження рівня прозапальних цитокінів у гіпокампі: TNFα - до 28,3, проти 63,8 нг/г протеїну, після введення агрегатів β-амілоїдних пептидів 42; IL-6 - до 44,7, проти 72,8 нг/г протеїну; зниження рівня протизапального IL-10 - до 122,4, проти 254,3 нг/г протеїну, відповідно. В неокортексі виявлено зниження TNFα до 13,2, проти 46,2 нг/г протеїну, після введення агрегатів β-амілоїдних пептидів 42; IL-6-26,8, проти 80,8 нг/г протеїну, відповідно, IL-10-89,4, проти 150,8 нг/г протеїну, що інформує про специфічне пригнічення цитокінової ланки нейрозапалення у цільових структурах мозку (гіпокампі та неокортексі), після впливу ліпосомальним куркуміном.

Таким чином, назальна терапія за допомогою ліпосомального куркуміну сприяла його активному транспорту у передні відділи головного мозку та викликала пригнічення нейрозапалення у структурах мозку, які відповідають за реалізацію пам'яті.

Відомості, які підтверджують можливість здійснення запропонованого рішення задачі полягають у наступному.

Суть. Для здійснення способу більш доцільним є залучення суміші кур-куміноїдів: куркуміну (77 %), диметоксикуркуміну (18 %) і бісдиметоксикуркуміну (решта) або куркуміну виробництва (Sigma-Aldrich, США). Також необхідні холестерол (Sigma-Aldrich, США), поліетиленгліколь (A.C.E.F., S.p.A., Італія), лецитин соняшнику SFPL "НВП БІОЛЕР" (Україна), а також екструдер

"Liposo Fast-Basic LF-1" (Avestin, США) з комплектом полікарбонатних мембран LFM-50, 100, 200 з діаметром отворів 50, 100 і 200 нм, відповідно.

Для отримання ліпосомальної форми куркуміну за умов запропонованого способу видаляють вологу і знежирюють лецитин соняшнику, виділяючи фосфоліпіди. Фосфоліпіди знежиреного лецитину соняшнику, холестерол та поліетиленгліколь змішують при співвідношенні масових частин 3,65:1,80:0,04, відповідно, розчинюють, додають водно-етанольний розчин куркуміну у співвідношенні 1:(10-15) до фосфоліпідів, та піддають випаровуванню, до утворення сухої ліпідної плівки, потім гідратують додаванням необхідної кількості деіонізованої води, відділяють речовини, не включені в ліпосоми, за допомогою центрифуги, і здійснюють послідовну екструзію суміші через мембрани, з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Тож, за результатом опрацювання режиму розчинення сумішей фосфоліпідів знежиреного лецетину соняшнику, холестеролу та поліетиленгліколю досягають поліпшення інкапсуляції куркуміну, стабільності ліпосом під час зберігання та активації фармакологічної дії куркуміну.

Запропоноване рішення задачі відповідає умові "промислова придатність", оскільки перевершує досягнення об'єктів минулого покоління, стаючи корисним у виробництві продуктів для медицини, біохімії і фармацевтичної промисловості.

Джерела інформації:

1. Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. Therapy Jorn. of Nanotechnology. 2012, Article ID.

2. Спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин: Пат. 76393 України, МПК: A61K 9/127, A61K 31/353, A61K 47/44, A61P 39/06, A 61P 31/00, A61P 35/00 /Інститут фармакології та токсикології АМН України; Стефанов О.В., Григор'єва Г.С., Соловйов А.І., Пасечнікова Н.В., Конахович Н.Ф., Хромов О.С, Краснопольський Ю.М. (Україна). - № a200604675; заявл. 27.04.2006; опубл. 17.07.2006.

3. Preparation method for curcumin long circulating liposomes: Pat. CN103637988 EP, Int.Cl: A61K 31/12, A61K 47/34, A61K 9/127, A61P29/00, A61P35/00, A61P 39/06 /Univ zhejiang Chinese medical (CN); Li Fanzhu, You Jia, Wang Guowei, Wei Yinghui, Xu Junjun, Guo Manman (CN). - № CN20131414165; prior. 11. 09.2013; publ. 19.03.2014.

4. Способ получения липосомальной формы кверцетина: Пат. 201201593 ЕПВ, МПК: A61K 31/352, A61K 9/127 /ООО "Технология лекарств" (Россия); Шоболов Д.Л., Ульянов А.М., Тарасов В.В., Балабаньян В.Ю., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. (Россия). - № 201201593; заявл. 24.12.2012; опубл. 29.05.2015.

5. Спосіб отримання ліпосомальної форми АТФ для перорального застосування: Пат. 77865 України, МПК: A23J 7/00, A61K 9/127, A61K 31/7076 /Притульська Н.В., Хробатенко О.В., Шульга С.М. (Україна). - № u201210974; заявл. 20.09.2012; опубл. 25.02.2013.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання ліпосомальної форми куркуміну, що включає розчинення суміші фосфоліпідів соняшника, холестеролу і поліетиленгліколю, додавання розчину біологічної активної речовини, випаровування суміші до утворення ліпідної плівки, гідратацію, заморожування за температури -50 °С, танення за +30 °С і відділення не включених в ліпосоми речовин шляхом центрифугування, який **відрізняється** тим, що додатково, перед розчиненням, лецитин соняшника знежирюють, видаляють вологу, виділяють фосфоліпіди, які вводять у суміш у співвідношенні масових частин фосфоліпідів, холестеролу і поліетиленгліколю як 3,65:1,80:0,04, відповідно, додають задану кількість куркуміну у співвідношенні куркумін:ліпіди 1:10-15 як біологічну активну речовину, розчиняють у розчиннику, далі суміш випарюють в потоці газу азоту (N_2) за температури 45-50 °С у роторному випарювачі до утворення сухої ліпідної плівки, потім плівку гідратують з додаванням необхідної кількості деіонізованої води, для однорідності розчин проводять через температуру фазового переходу ліпідів шляхом охолодження і нагрівання та здійснюють послідовну екструзію через мембрани з діаметром отворів 200, 100 і 50 нм.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,

вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

РОЗДІЛ 4
МОЛЕКУЛЯРНІ ТА СТРУКТУРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ СПЕЦИФІЧНОЇ ВЗАЄМОДІЇ АМІЛОЇДНИХ ПЕПТИДІВ

В розділі IV представлено результати досліджень *in silico* взаємодії мономерів β-амілоїдних пептидів в β-амілоїдних агрегатах (гексамерах, нонамерах та фібрилах), впливу іонів Zn на структуру β-амілоїдних наномерів і взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ. Патогенез хвороби Альцгеймера (AD) супроводжується виникненням старечих бляшок, що складаються з бета-амілоїдних-пептидів (Aβ). Aβ має декілька гідрофобних амінокислотних залишків і, завдяки гідрофобній взаємодії між ними, Aβ можуть утворювати стабільні агрегати у воді, що призводить до утворення Aβ фібрил. Зокрема, міжмолекулярна взаємодія в двох β –листових ділянках сусідніх Aβ сприяє стабілізації агрегатів Aβ. Для моделей Aβ гексамера було оптимізовано їх структури у воді методом ММ та визначено найбільш стабільну модель Aβ гексамера. Показано, що бічні ланцюги заряджених залишків Asp23 та Lys28 утворюють сольовий місток у кожному з шести мономерів (D, E, F, G, H, I), що веде до щільної упаковки Aβ гексамерів. У воді взаємодія між мономерами складеної Aβ пари вносить більший внесок у стабільність гексамерів, ніж взаємодія між мономерами тримерів за рахунок електростатичної взаємодії групи NH_3+ бічного ланцюга Lys28 та групи COO^{--} бічного ланцюга Asp23 і виникнення мережі водневих зв'язків. Для моделей Aβ нонамерів, які складалась з трьох складених шарів тримера Aβ (1-40), знайдено оптимальну конформацію. Показано протонізацію залишків гістидину в нонамерах His+, а N- і C-кінці кожного Aβ-пептиду закінчувались незарядженим ацетилом і групою NH_2, відповідно. Енергія взаємодії між пептидами пар Aβ (A-D, B-E, C-F, D-G, E-H та F-I) значно більша порівняно з іншими, а енергія взаємодії між Aβ пептидами C і F найбільша. Такі пари уворюються між укладеними пептидами сусідніх шарів. В укладених агрегатах Aβ електронний заряд розподіляється по амінокислотним залишкам, що виходять в N-термінал та домени повороту.

Стабільність сольватованого Aβ-нонамера залежить суттєво від молекул води, що оточують нонамер, а завдяки електростатичній взаємодії між зарядженими частинами укладених структур, нонамери Aβ наближаються один до одного і утворюють великі Aβ агрегати. Для аналізуваня *in vivo* Aβ фібрили будували дві моделі Aβ гексамера, які складались з Aβ мономерів A, B, C, D, E, F, G, H, I. Перший гексамер, який називається верхнім гексамером, складається з першого та другого шарів нонамера, а другий - нижчий гексамер утворюється з другого і третього шарів. Молекули води утворюють мережу водневих зв'язків між бічними ланцюгами Glu22 (E) та Arg5 (F). Крім того, заряджена групи Arg5 (F) взаємодіє з COO^{---} групою Asp23 (E). Існує також взаємодія заряджених груп Lys28 (E) та Asp7 (F). Взаємодія мономерів E і F пов'язана з мережею водневих зв'язків з молекулами води, а також електростатичною взаємодією між зарядженими групами залишків. Запропоновано модель агрегації Aβ де Aβ мономери складаються для утворення полімерів, таких як димери, тример тощо. Електростатична взаємодія між зарядженими залишками в домені повороту та N-кінцевому домені і його сусіднім полімером сприяє руху цих залишків ближче один до одного і утворенню фібрил. У мозку хворих на AD було виявлено агрегати Aβ різних розмірів від димерів до фібрил і аномальне накопичення іонів металів Zn, Cu і Fe та асоціація між Aβ агрегатами і іонами цих металів. Досліджено вплив іонів Zn на стабільність Aβ-агрегатів з та без іонів Zn і зміни структури Aβ-агрегатів індукованих іонами Zn. Визначено, що завдяки додаванню трьох іонів Zn до Aβ нонамера його структура стабілізується, щоб зберегти свою тривимірну симетрію. Для комплекса (Aβ нонамер + Zn) показано, що два іони Zn координуються до негативно заряджених COO^{-} груп Glu11, що існують у N-кінцевій частині Aβ мономерів, сприяючи стабілізації комплекса. Туберкульоз (ТВ), одне з найпоширених інфекційних захворювань. Білок FtsZ відіграє важливу роль у формуванні клітинних стінок в процесі клітинного ділення. Проведено симуляцію специфічної взаємодії FtsZ з інгібіторами Zantrin Z3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine) та його диметил ZZ3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl] benzo[g] quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine.

Показано, що ZZ3 має більш високу спорідненість до FtsZ, ніж Z3, а Met163, Gly164, Ser176, Glu179 та Ala235 сприяють зв’язуванню ZZ3 з FtsZ. Визначено, що Z3 та ZZ3 ефективні для інгібування агрегації FtsZ шляхом зміни конформації петлі H6/H7, яка сприяє агрегації.

4.1 Специфічні взаємодії та конформаційні зміни β-амілоїдних мономерів в β-амілоїдних гексамерах

Chemical Physics Letters 672 (2017) 13–20

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Research paper

Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: *Ab initio* fragment molecular orbital calculations in water

Hiromi Ishimura [a], Shogo Tomioka [a], Ryushi Kadoya [a], Kanako Shimamura [a], Akisumi Okamoto [a], Sergiy Shulga [b], Noriyuki Kurita [a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi 441-8580, Japan
[b] Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 December 2016
In final form 12 January 2017
Available online 21 January 2017

Keywords:
Amyloid beta
Alzheimer's disease
Molecular simulation
Fragment molecular orbital
Molecular mechanics
Protein-protein interaction
Aggregation

ABSTRACT

The accumulation of amyloid-beta (Aβ) aggregates in brain contributes to the onset of Alzheimer's disease (AD). Recent structural analysis for the tissue obtained from AD patients revealed that Aβ aggregates have a single structure with three-fold symmetry. To explain why this structure possesses significant stability, we here investigated the specific interactions between Aβ peptides in the aggregate, using *ab initio* fragment molecular orbital calculations. The results indicate that the interactions between the Aβ peptides of the stacked Aβ pair are stronger than those between the Aβ peptides of the trimer with three-fold symmetry and that the charged amino-acids are important.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The molecular pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is accompanied by senile plaques comprised of amyloid-beta peptides (Aβs) in a diseased brain [1]. Aβs with a variety of lengths are produced from the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by both β- and γ-secretases [2]. The most abundant Aβs contained in the senile plaques are Aβ40 and Aβ42 [2,3], each of which has 40 or 42 amino acid residues, respectively. Aβ42 was found to aggregate more rapidly and comprise a major component of the senile plaques in a diseased brain [4–6]. These plaques cause the death of neuronal cells in the brain [7], leading to the onset of AD.

Aβs have several hydrophobic amino acid residues, and due to the hydrophobic interactions between them, Aβs can form strong aggregates in water, leading to a formation of Aβ fibrils [8]. In particular, intermolecular contacts within the two β-sheet regions of the neighboring Aβs contribute to stabilizing Aβ aggregates. Therefore, agents having a strong binding affinity to the β-sheet region of Aβ are expected to inhibit Aβ aggregation and be a potent inhibitor against the pathogenesis of AD [9,10].

In the design of potent inhibitors against the Aβ aggregation, it is necessary to make clear the structure of the Aβ fibrils as well as the mechanism of the aggregation. Since the Aβ fibrils are not easily crystalized and dissolved, it is difficult to determine their structures from the X-ray crystallography or solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) analyses [11]. To resolve this problem, solid-state NMR (ssNMR) and electron paramagnetic resonance (EPR) techniques have been widely used for the structural analyses of Aβ fibrils [12,13]. These analyses revealed that the Aβ fibrils formed *in vitro* can show significant structural diversity, depending on the conditions encountered during their nucleation [13]. On the other hand, Lu et al. [14] revealed a novel structural model for the *in vivo* Aβ fibrils, based on the ssNMR analyses for the Aβ fibrils derived from the brains of two different AD patients. Each of these *in vivo* Aβ fibrils has a single and patient-specific structure possessing three-fold symmetry with respect to the axis of fibril growth. This model is profoundly different from the models for the *in vitro* Aβ fibrils [13] showing significant structural diversity. The illumination of the structural insight for these *in vivo* Aβ fibrils must be useful for structure-based drug design for treating ADs.

* Corresponding author at: Toyohashi University of Technology, Department of Computer Science and Engineering, Tempaku-cho, Toyohashi 441-8580, Japan.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.041
0009-2614/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Molecular simulations such as molecular mechanics (MM) and molecular dynamics (MD) ones for Aβ fibrils are also efficient for investigating their stable structures and the mechanism of aggregation at an atomic level. Kahler et al. [15] carried out a systematic computational study based on all-atom classical MD simulations for many types of fibrillary Aβ oligomers and concluded that the pairs of Aβ protofilaments are important as a seed for forming Aβ fibrils. In addition, by using enhanced MD simulations [16], the factors that modulate the stability of the *in vivo* Aβ fibrils [14] with threefold symmetry were investigated to find that the fibrils lack the polymorphism detected for the *in vitro* fibrils [13].

Although classical MD simulations are very powerful tools for investigating the structural change of biomolecules such as proteins, DNA, RNA and their complexes with ligand, the MD simulation is based on the parameters of the force fields between atoms, so that the results depend on the force fields employed in the MD simulation. In contrast, *ab initio* molecular orbital (MO) calculations employ no parameters and can analyze the electronic properties of molecules. Since the conventional *ab initio* MO calculations for large molecules require a large amount of computation time and computer processing facility, it is not practical to apply these MO methods for large molecules. To solve this problem, the fragment MO (FMO) method was developed by Kitaura et al. [17,18], and the electronic states of biomolecules were obtained in a realistic computational time. Recently, FMO has been widely used for analysis of specific interactions between protein and many types of ligand molecules at an electronic level [19,20]. The FMO results might be useful for designing novel medicines against the disease related with the target protein.

In our preliminary study [21], we employed a model of Aβ nonamer obtained by the ssNMR analysis for a Aβ fibril derived from the brain of an AD patient [14] and investigated the specific interactions between the Aβ monomers in the *in vivo* Aβ hexamer with threefold symmetry, using *ab initio* FMO calculations. The FMO results revealed that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pair contribute to the hexamer stability more significantly than those between the monomers existing in the same layer. In the present study, to confirm the adequacy of the results, we employ 20 models of the *in vivo* Aβ nonamer [14] registered in PDB and carry out structure optimizations in water by the classical MM method and *ab initio* FMO calculations for the optimized structures. Based on the electronic properties evaluated by the FMO method, we highlight the key amino acid residues of Aβ, which contribute mainly to the formation of the Aβ hexamer, and the mechanism of Aβ aggregation is predicted.

2. Details of *ab initio* molecular simulations

As an initial structure of the Aβ fibril model, we here employed the PDB structure (PDB ID: 2M4J) [14] obtained by the ssNMR analysis. This PDB file contains 20 models for the Aβ40 nonamer, and each model consists of three stacked layers of Aβ40 trimer with three-fold symmetry. In our previous study [21], model 1 was used for the FMO calculation. Since the size of the solvated Aβ40 nonamer is so large for *ab initio* FMO calculation, we made two types of hexamer models, one of them is built from the first and the second layers while the other is built from the second and the third layers of the Aβ40 nonamer. From the comparison of the total energies evaluated by *ab initio* FMO calculations, the hexamer composed of the second and the third layers was found to be more stable [21]. Therefore, we here constructed 20 hexamer models from the second and the third layers of each of the 20 nonamer models registered in PDB [14] and investigated the structures and electronic properties of the 20 models by MM and FMO calculations. It is noted that these hexamer models are the smallest ones for investigating which interaction between Aβ40 monomers in the trimer, or between those of the stacked Aβ40 pair, is more significantly involved in the stabilization of Aβ40 fibril structure.

The N- and C-termini of each Aβ40 were terminated by the uncharged acetyl and NH_2 groups, respectively, because the MM optimization for the Aβ40 hexamer with the charged termini leads to a highly deformed structure, when counter ions around the charged termini are not considered. To determine the protonated states of three His residues contained in Aβ40, we evaluated their pK_a values by use of PROPKA 3.1 [22,23]. All of the three His residues have pK_a values larger than 6, so that their protonations were assigned as Hip^+. The other ionisable residues contained in Aβ40 are assigned as an ionized state, since this protonation state makes the total charge of Aβ40 neutral. To consider the solvation effect on the Aβ hexamer properly, we added water molecules within a 6 Å layer around the hexamer and fully optimized the solvated structure of the Aβ hexamer, by use of the classical MM and MD simulation program AMBER12 [24]. In the MM optimization, the AMBER99SB [25] and TIP3P [26] force fields were assigned for Aβ residues and the water molecules, respectively.

The electronic properties for the solvated Aβ hexamers were investigated by the *ab initio* FMO method [17–20] in order to determine which model of Aβ hexamer is the most stable and highlight which amino acid residues of Aβ monomer are important for stabilizing the Aβ hexamer structure with three-fold symmetry. In principle, the Aβ hexamer structures should be optimized by the same *ab initio* FMO method. However, because the *ab initio* structure optimization is not practicable for large molecules such as the solvated Aβ hexamers, we employed the classical MM method of AMBER12 [24] for optimizing the structures of the 20 models.

In the FMO calculations, the target molecule is divided into units each of which is called 'fragment', and the electronic properties of the target molecule are estimated from the electronic properties of the monomers and the dimers of the fragments. The specific interactions between the fragments can be investigated from the interaction energies obtained by the FMO calculation. In the present FMO calculations, the water molecules existing within a 6 Å distance from the Aβ hexamer surface were considered explicitly. Each Aβ residue and each water molecule were assigned as a fragment, because this fragmentation enables us to evaluate the interaction energies between the Aβ residues and between the residue and the solvating water molecule. The *ab initio* MP2/6-31G method was employed to accurately investigate the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between the Aβ residues. The FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [20,27] was used. In addition, to elucidate which residues of Aβ contribute to the stability of the hexamer conformation, we investigated the inter fragment interaction energies (IFIE) [28] obtained by the FMO method.

3. Results and discussion

3.1. Stable structure of Aβ hexamer in water

Based on the Aβ40 nonamer structures registered in PDB (PDB ID: 2M4J) [14], we constructed 20 models of Aβ hexamer and fully optimized them in water by the MM method based on AMBER12 force fields [24]. Fig. 1 shows the optimized structures of model 1, employed in our previous study [21] and model 19, which is determined to be most stable in the viewpoint of total energy evaluated by the present FMO method. Both optimized structures keep their three-fold symmetry, and similar structures were obtained for the other 18 models. To make clear the effect of the MM optimization, we analyzed the root mean square distance (RMSD) between the PDB [14] and the MM optimized structures for the

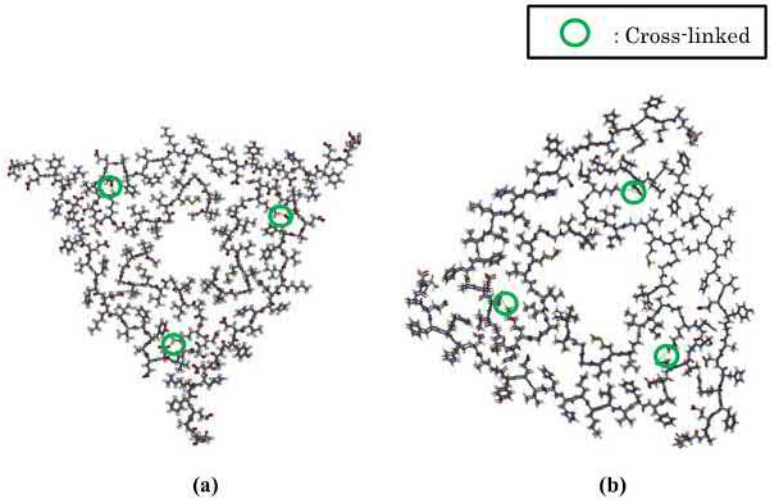


Fig. 1. Structures of Aβ hexamers optimized by MM method in water; (a) model 1 and (b) model 19 (most stable) registered in PDB [14]. Three-fold symmetry is hold by the cross-linked interactions between monomers (Asp23 and Lys28) existing in the same layer.

20 models. The RMSD values for the 20 models are in a range between 11.6 and 14.2 Å, indicating that the PDB structures are changed significantly by the MM optimization in explicit waters. Fig. 1 also elucidates that the structures around the corners of the triangle of Aβ trimers are significantly different between the two structures.

In the optimized structures of Aβ hexamers, the side chains of the charged residues Asp23 and Lys28 form a salt bridge in each of the six monomers, leading to the densely-packed structure of the Aβ hexamer with three-fold symmetry. As listed in Table S1 of the supplementary information, the distance of the salt bridge is distributed widely from 1.64 to 3.19 Å, although all monomers in the hexamer have a salt bridge between the same residues. This result is consistent with those obtained by the ssNMR [14] and the classical MD simulations [16]. It is also elucidated from the trimer structure in the same layer that the N-terminal Ser8 of each Aβ monomer forms hydrogen bonds with both Ser26 and Asn27 of the turn-domain of the neighboring Aβ monomer. These specific hydrogen bonds are expected to contribute to the stabilization of the trimer with three-fold symmetry.

In order to determine which model is the most stable among the 20 ones, we investigated the total energies of the Aβ hexamers for the PDB and the MM optimized structures, by use of *ab initio* MP2/6-31G calculations of FMO. It is noted that the water molecules existing within 6 Å from the surface of the hexamer were considered explicitly. The number of water molecules was combined to be 1219 for the all models. As listed in Table 1, for the PDB structures, model 19 is the most stable and the TEs of the 20 models are widely distributed within a 13088.1 kcal/mol energy. By optimizing the PDB structures using the MM method, the TEs of the 20 models are stabilized at least 2279.8 kcal/mol for all models to find that model 19 is the most stable in the MM optimized structures. The distribution width of the TEs for the 20 models is significantly decreased to be 2715.1 kcal/mol by the MM optimizations. This result indicates that more realistic stable structures of the solvated Aβ hexamer are obtained by the MM optimizations in water.

To clarify the reason why model 19 is the most stable in water among the 20 models, we investigated the interaction energies (IEs) between Aβ residues, between Aβ residues and waters, and between waters. These IEs were evaluated from the sum of IFIEs between the involved fragments. As listed in Table 2, the TE of model 19 is 1555 kcal/mol lower than that of model 1. The IE between Aβ residues of model 19 is 990 kcal/mol lower than that of model 1, and the IE between waters is 2737 kcal/mol lower. Accordingly, it is elucidated from Table 2 that the stability of the solvated structure of model 19 comes mainly from the stability of solvating water molecules around the Aβ hexamer. This result is similar to that for the solvated Aβ monomer obtained by our molecular simulations [29] based on the replica-exchange MD and *ab initio* FMO methods.

As described above, there is a possibility that water molecules significantly contribute to the stabilization between Aβ monomers in the solvated Aβ hexamer, and that the difference in hydrogen bonding conformations of the water molecules creates a significant difference in the stability of the solvated Aβ hexamer. Accordingly, we conclude that it is indispensable to consider water molecules explicitly for investigating the stable structures of Aβ hexamer as well as other Aβ aggregates. In addition, the aggregation mechanism of Aβ monomers is also remarkably affected by water molecules existing between the monomers. In order to clarify the effect of water molecules on the structure of Aβ fibrils, we are currently conducting classical MD simulations for the solvated Aβ nonamer with three-fold symmetry. For some snapshots obtained by the MD simulations, we will carry out MM-optimizations and FMO calculations to confirm that the above-mentioned results for the solvated Aβ hexamers are also true for the other conformations of the solvated Aβ nonamer. The results will be published elsewhere.

3.2. Specific interactions between Aβs in the Aβ hexamer

In the previous subsection, model 19 of the Aβ hexamer was found to be the most stable among the 20 models in explicit waters. We thus investigated specific interactions between Aβ monomers for the model 19 structure of the Aβ hexamer in what follows.

To reveal which interactions between monomers in the Aβ hexamer are more important for the stabilization of the hexamer, we evaluated the IEs between monomers for the solvated Aβ hexamer

Table 1
Total energies (TE: kcal/mol) evaluated by FMO for the PDB structures and the optimized structures by MM method for the 20 models registered in PDB [14].

Model	PDB		MM structure		Change in TE
	TE	ΔTE	TE	ΔTE	
1	−139259313.7	726.9	−139261619.4	1554.8	−2305.6
2	−139259714.0	326.7	−139262413.3	760.9	−2699.3
3	−139259842.1	198.5	−139262273.5	900.7	−2431.4
4	−139259406.3	634.4	−139261686.1	1488.1	−2279.8
5	−139259406.3	634.4	−139261943.7	1230.5	−2537.4
6	−139259149.8	890.8	−139261752.8	1421.4	−2603.0
7	−139259105.9	934.7	−139261736.8	1437.4	−2630.9
8	−139257888.7	2151.9	−139261736.8	1437.4	−3848.1
9	−139257212.9	2827.7	−139260863.4	2310.8	−3650.5
10	−139258111.2	1929.5	−139261204.9	1969.3	−3093.7
11	−139249466.5	10574.2	−139260804.8	2369.4	−11338.4
12	−139250208.7	9832.0	−139261510.1	1664.1	−11301.4
13	−139257705.7	2334.9	−139260622.6	2551.6	−2916.9
14	−139255894.5	4146.1	−139261171.2	2003.0	−5276.7
15	−139246952.6	13088.1	−139260459.1	2715.1	−13506.5
16	−139257424.2	2616.5	−139260695.6	2478.6	−3271.4
17	−139259001.1	1039.6	−139262153.0	1021.2	−3151.9
18	−139258225.4	1815.3	−139261460.5	1713.7	−3235.1
19	−139260040.7	0.0	−139263174.2	0.0	−3133.6
20	−139258297.4	1743.2	−139261485.1	1689.2	−3187.7

Table 2
Total energy (TE: kcal/mol), interaction energies between Aβ residues, between Aβ residues and solvating waters, and between solvating waters for the MM optimized structures of the models 1 and 19 registered in PDB [14].

	TE	Interaction energy		
		Aβ residues	Aβ and waters	Waters
Model 1	−139261619.4	−8460.4	−14307.7	−47478.7
Model 19	−139263174.2	−9450.6	−13888.0	−50215.4
Difference	−1554.8	−990.2	419.7	−2736.7

by use of the *ab initio* FMO method. As indicated in Table 3, the IEs between the monomers of the trimer formed in the same layer are at largest −103.4 kcal/mol. In contrast, the IEs between the monomers of the stacked Aβ pairs between the two layers are in a range between −330.3 and −442.4 kcal/mol. This result demonstrates that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pairs contribute more significantly to hexamer stability than those between the monomers of the trimmers. In our previous study [21], similar results were obtained for the model 1 structure registered in PDB (PDB ID: 2M4J) [14]. The stacked structures between the paired monomers (D–G, E–H, and F–I) are shown in Fig. S1 of the supplementary information, indicating that there are many hydrogen bonds between the stacked monomers. We furthermore confirmed that a similar trend in IEs between monomers is obtained for the other 19 models of the MM optimized structures. The details of the results are indicated in Table S2 of the supplementary information.

To clarify the reason for the large IE between the monomers making the stacked pairs, we investigated the IFIEs between each residue of these paired monomers and highlighted the important residues for the strong interaction between the monomers. Fig. 2 shows the map of IFIEs, in which attractive and repulsive interactions are indicated in blue and red, respectively, indicating that there are strong interactions between some specific residues. Table 4 lists the pairs of the residues and the IFIEs between them, whose size of IFIE is larger than 40 kcal/mol. It should be noted that all residues contributing to the strong attractive interactions are charged ones. Table 4a indicates that the pairs of Lys28 and Asp23, His13 and Glu11, Arg5 and Glu3, and Arg5 and Asp7 have strong attractive interactions between the monomers D and G. In particular, the IFIEs of the Lys28–Asp23 and the His13–Glu11 pairs are significantly large, indicating the importance of these pairs for stabilizing the Aβ hexamer structure. Since the all residues listed in Table 4a are charged residues, the electrostatic interactions between these charged residues contribute mainly to the strong attractive interaction between the monomers D and G. As shown in Fig. 2b and c as well as Table 4b and c, the similar trend is observed for the pairs between E and H, and between F and I monomers.

Table 3
Interaction energies (kcal/mol) between monomers of Aβ hexamer (model 19) evaluated by FMO. Monomers D and G, E and H, and F and I are stacked to make pairs between two layers in the hexamer, respectively.

Model 19		Layer 1			Layer 2		
		D	E	F	G	H	I
Layer 1	D	–	–	–	–	–	–
	E	−78.3	–	–	–	–	–
	F	−48.5	−103.4	–	–	–	–
Layer 2	G	−442.4	−19.7	−28.4	–	–	–
	H	−23.1	−330.3	−21.3	−96.8	–	–
	I	−11.5	−26.9	−350.1	−86.0	−87.1	–

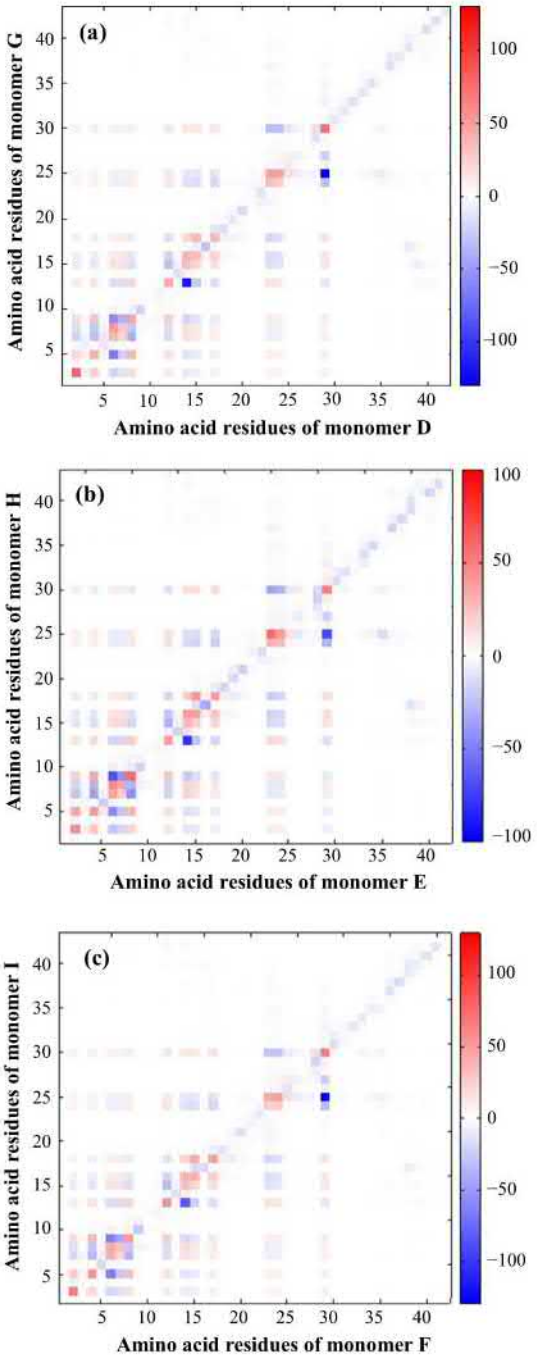


Fig. 2. Interaction energies (kcal/mol) between amino acid residues of the paired monomers between layers; (a) D and G, (b) E and H, and (c) F and I. Sequence of amino acid residues in Aβ40 peptide is as follows. D1AEFRHDSGY10EVHHQKLVFF 20AEDVGSNKGA30IIGLMVGGVV40.

We furthermore analyzed the structures of the interacting residues to elucidate the origin for their strong interactions between Lys28 and Asp23, between His13 and Glu11, between Arg5 and Glu3/Asp7. As shown in Fig. 3a, the NH_3^+ group of Lys28 side chain

Table 4
Interaction energies (IEs) between amino acid residues of monomers in Aβ hexamer (model 19) evaluated by FMO; (a) between monomers D and G, (b) E and H, and (c) F and I

Amino acid pairs	IE (kcal/mol)
(a) Between monomers D and G	
Lys28 – Asp23	−130.9
His13 – Glu11	−117.5
Arg5 – Glu3	−66.8
Arg5 – Asp7	−57.0
(b) Between monomers E and H	
Lys28 – Asp23	−70.7
His13 – Glu11	−80.5
Arg5 – Asp7	−67.5
Arg5 – Glu3	−44.4
(c) Between monomers F and I	
Lys28 – Asp23	−130.9
His13 – Glu11	−83.1
Arg5 – Asp7	−64.9
Arg5 – Glu3	−63.6

and the COO^- group of Asp23 side chain interact strongly by electrostatic interaction, and both groups exist near to each other to make two hydrogen bonds between them. As a result, the IFIE between Lys28 and Asp23 becomes very large. It is well known that Asp23 and Lys28 form a salt bridge in an Aβ monomer and determine the monomer conformation. Our present FMO calculations elucidate for the first time that the charged residues Asp23 and Lys28 contribute to not only the monomer conformation but the stability between the stacked Aβ monomers in the hexamer.

Similar interactions are formed between His13 and Glu11 as shown in Fig. 3b. The charged terminal groups of the both residues interact electrostatically to make hydrogen bonds between them. This interaction causes the large attractive IFIE between His13 and Glu11 as listed in Table 4a. In addition, the two NH_2 groups of the Arg5 side chain interact to the COO^- groups of Asp7 and Glu3, as shown in Fig. 3c. However, there is no hydrogen bond formed between the groups, so that the IFIEs between Arg5 and Glu3 or Asp7 are not so large compared with those between Lys28 and Asp23, and between His13 and Glu11, as listed in Table 4a. Therefore, it is concluded that the electrostatic interactions between the charged residues (Lys28, Asp23, His13 and Glu11) of the stacked Aβ monomers mainly contributes to causing a strong interaction between them.

Table 3 also indicates that the IFIE between the stacked monomers D and G is the largest and at least 90 kcal/mol larger than the IFIEs for the other pairs such as E–H and F–I pairs. The analysis of IFIEs between the Aβ residues elucidates that the repulsive interaction between the Asp1 residues of the D and G monomers is weaker than those for the E–H and the F–I pairs. The IFIEs are evaluated to be 41.0 kcal/mol, which is significantly smaller than those (55.0 and 64.5 kcal/mol) for the E–H and F–I pairs. Therefore, the difference in the repulsive IFIEs between the Asp1 residues of the two paired monomers is the main reason why the IE between the monomers D and G is more attractive than those for the E–H and the F–I pairs.

To reveal the stability of the Aβ trimer with three-fold symmetry, we investigated the specific interactions between the monomers existing in the same layer. As indicated in Table 3, the interaction energy between the monomers E and F in layer-1 is the largest. We thus investigated in detail the specific interactions between the residues of monomers E and F and highlighted which amino acid residues contribute to the strong interaction between them. As shown in Fig. 4a, there are strong attractive interactions between Lys28 and Asp7 (−38.8 kcal/mol) and between Asp23 and Arg5 (−34.0 kcal/mol). Asp23 and Lys28 exist at the N-

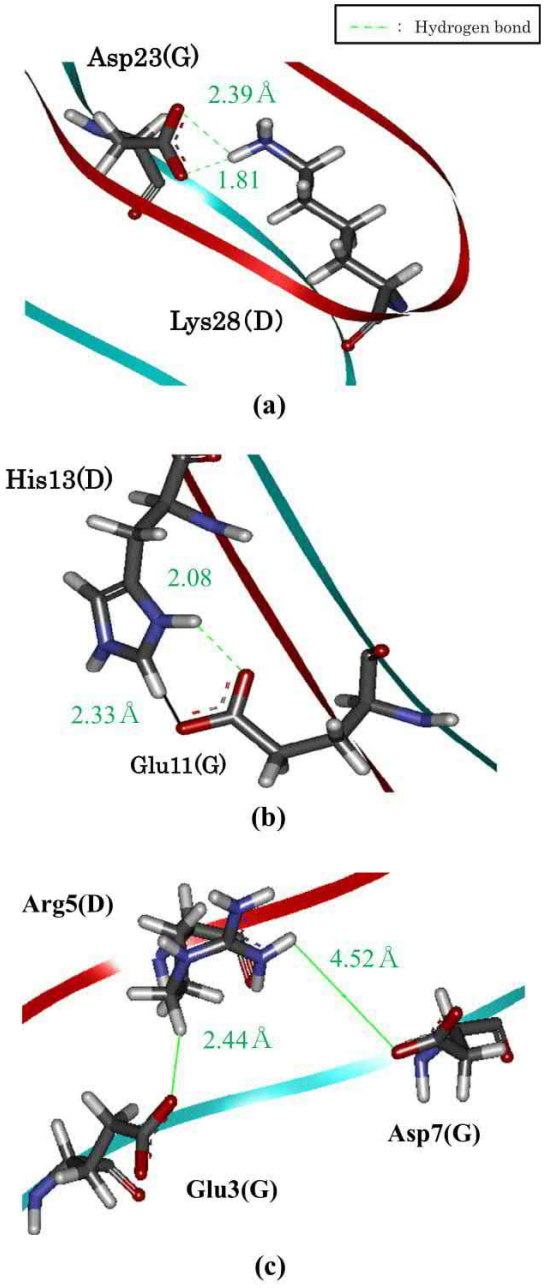


Fig. 3. Interacting structures between residues of monomers D and G: (a) Lys28 and Asp23, (b) His13 and Glu11, and (c) Arg5, Glu3 and Asp7.

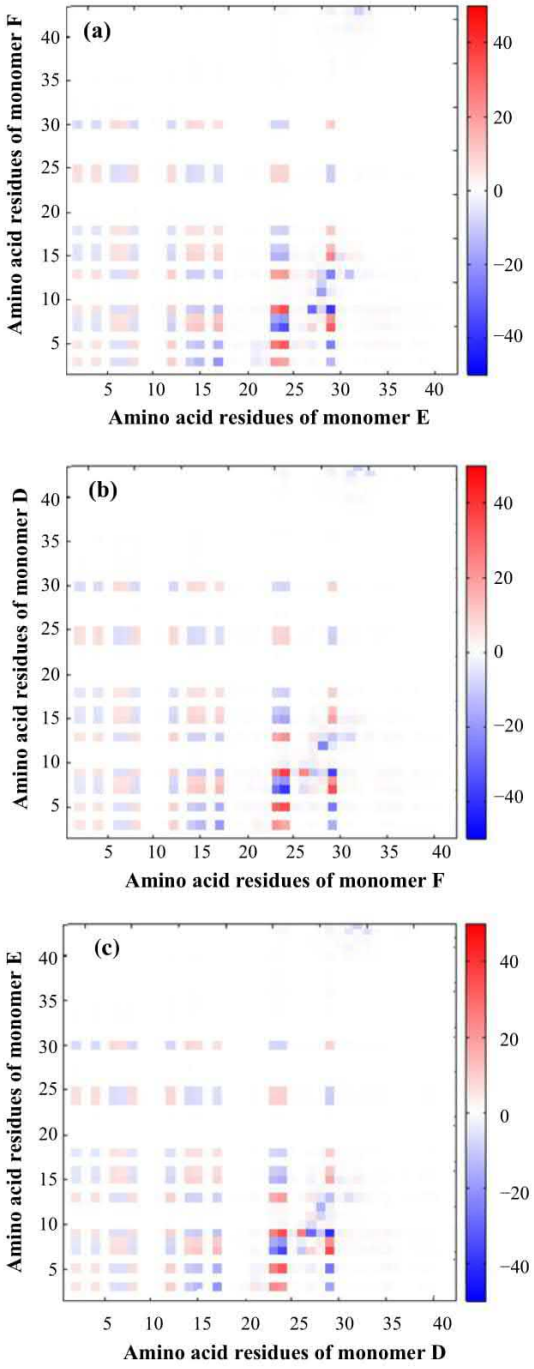


Fig. 4. Interaction energies (IE: kcal/mol) between the monomers of a trimer formed in the same layer for the optimized structure of model 19; (a) between monomers E and F, (b) F and D, and (c) D and E. Sequence of amino acid residues in Aβ40 peptide is as follows. D1AEFRHDSGY10EVHHQKLVFF20AEDVGSNKGA30IIGLMVGGVV40.

terminal of the monomer E, while Arg5 and Asp7 exist around the turn-domain of monomer F. Although there is no hydrogen bond between these paired residues, as shown in Fig. S2 of the supplementary information, all residues are charged amino acids and interact with the paired residue by electrostatic interactions, resulting in strong attractive interactions between the monomers E and F. It is therefore revealed from the above FMO analysis that the interactions between the N-terminal of the monomer and the turn-domain of the neighboring monomer are important for forming the trimer with three-fold symmetry. Similar interactions are observed between the monomers in the same layer as shown in Fig. 4b and c. In addition, the monomers G, H and I in the second layer interact with each other in the similar way as shown in Fig. S3 of the supplementary information.

As shown above, the IFIEs between the charged amino-acid residues of Aβs are overestimated in the present FMO calculations in explicit waters. To correct this overestimation, a protocol for obtaining statistically corrected IFIEs was proposed and tested for a realistic protein system [30]. This protocol as well as dielectric continuum solvation model will be used for getting more realistic IFIEs for the solvated Aβ hexamers.

3.3. Proposal for the mechanism of Aβ aggregation

It is necessary to understand the mechanism of Aβ aggregation for developing potent medicines against AD. The previous experiments [12,31–34] elucidated that the charged residues in Aβ contribute to the aggregation mechanism as well as the stability of β-sheets in the aggregates. However, the experimental study on the formation of Aβ fibrils and oligomers is confined to the observation of their dynamical properties [35]. On the other hand, Hou et al. [36] proposed a schematic picture for the initial stages of Aβ aggregation, based on their results obtained by solution NMR analysis. However, they concluded that it is difficult to analyze the entire mechanism of the aggregation, due to the limitation of the experiments.

In the present *ab initio* molecular simulations for the solvated Aβ hexamer, we first elucidated that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pairs contribute more significantly to the stabilization of the hexamer than those between the monomers of the trimers formed in the same layer. In addition, the interactions between the charged residues of the turn-domain of Aβ monomer and the N-terminal domain of its neighboring monomer were found to be important for the formation of the trimer. Based on these results simulated, the following hypothetical model for the Aβ aggregation mechanism can be proposed.

(1) Aβ monomers are stacked to build polymers such as dimer, trimer, and so on.
(2) In these polymers, positive and negative charges are localized at the charged residues of the turn and the N-terminal domains.
(3) Three polymers get closer to each other to make a fibril with three-fold symmetry as shown in Fig. 1. In this step, electrostatic interactions between the charged residues at the turn-domain of a polymer and the N-terminal domain of its neighboring polymer contribute to getting these domains closer to each other and constructing a fibril with three-fold symmetry.

From the view points of the interaction energies between the Aβ monomers shown in Table 3, the mechanism, in which the trimer with three-fold symmetry is created at first, is energetically unfavorable.

If the above mentioned hypothetical model is correct, we can propose an efficient agent for inhibiting the mechanism. Focused on the Step (3) of the above mechanism, an agent for blocking the formation of a fibrils with three-fold symmetry is proposed as a potent inhibitor against the Aβ aggregation. This agent binds specifically to the charged residues at the turn-domain or at the N-terminal domain of Aβ, in order to shield the charge of the residues and weaken their electrostatic interactions with the other charged residues. In our previous molecular simulations [37] for the complexes of Aβ monomer with curcumin derivatives, some novel curcumin derivatives were proposed as an efficient agent for inhibiting the attack of γ-secretase to Aβ. The same procedure of molecular simulations will be applied for proposing novel agents for inhibiting the Aβ aggregation.

4. Conclusions

Using *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations, we investigated the specific interactions between the Aβ monomers in the hexamer, whose structure is optimized by the molecular mechanics method in water starting from the *in vivo* model structure [14] of the Aβ nonamer obtained from the brains of AD patients. The FMO calculations for the 20 model structures reveal that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pair contribute to hexamer stability more significantly than those between the monomers of the trimer formed in the same layer. In addition, it is elucidated that charged amino acid residues such as Arg5, Asp7, Asp23 and Lys28 mainly contribute to the strong attractive interactions between the paired monomers. Therefore, it is expected that agents binding specifically to these charged residues of Aβ can be potent inhibitors against Aβ aggregation.

Acknowledgements

This study is supported by Open Partnership Joint Projects of JSPS Bilateral Joint Research Projects between Toyohashi University of Technology and the three institutes of National Academy of Science of Ukraine as well as the grants from the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.041.

References

[1] F.M. Laird et al., BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions, J. Neurosci. 25 (2005) 11693–11709.
[2] D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, Physiol. Rev. 81 (2001) 741–766.
[3] M. Rak et al., Dense-core and diffuse Aβ plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy, Biopolymers 87 (2007) 207–217.
[4] S.A. Gravina et al., Amyloid-β protein (Aβ) in Alzheimer's disease brain, J. Biol. Chem. 270 (1995) 7013–7016.
[5] A.E. Roher et al., β-Amyloid-(1–42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993) 10836–10840.
[6] J.T. Jarrett, E.P. Berger, P.T. Lansbury Jr., The carboxy terminus of the β-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, Biochemistry 32 (1993) 4693–4697.
[7] M.A. Findeis, The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease, Pharmacol. Ther. 116 (2007) 266–286.
[8] S.W. Pimplikar, Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease, Int. J. Biochem. Cell Biol. 41 (2008) 1261–1268.
[9] P.T. Lansbury Jr., Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease, Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997) 260–267.
[10] A.J. Doig, Peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation, Curr. Opin. Drug Disc. Dev. 10 (2007) 533–539.
[11] L.K. Thomoson, Unraveling the secrets of Alzheimer's β-amyloid fibrils, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 383–385.
[12] A.T. Petkova et al., Self-propagating, molecular level polymorphism in Alzheimer's β-amyloid fibrils, Science 307 (2005) 262–265.
[13] R. Tycko, Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils, Protein Sci. 23 (2014) 1528–1539.
[14] J.X. Lu et al., Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue, Cell 154 (2013) 1257–1268.
[15] A. Kahler, H. Sticht, A.H.C. Horn, Conformational stability of fibrillary amyloid-beta oligomers via protofilament pair formation – a systematic computational study, PLoS ONE 8 (2013) e70521.
[16] E.J. Alred, M. Phillips, W.M. Berhanu, U.H.E. Hansmann, On the lack of polymorphism in Aβ-peptide aggregates derived from patient brains, Protein Sci. 24 (2015) 923–935.
[17] K. Kitaura et al., Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 701–706.
[18] T. Nakano et al., Fragment molecular orbital method: application to polypeptides, Chem. Phys. Lett. 318 (2000) 614–618.

[19] D.G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method, Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 7562–7577.
[20] S. Tanaka et al., Electron-correlated fragment-molecular-orbital calculations for biomolecular and nano systems, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 10310–10344.
[21] H. Ishimura, et al., Ab initio fragment molecular orbital calculations on the specific interactions between amyloid-β peptides in an in vivo amyloid-β fibril, in: 2016 Int. Conf. on Advanced Informatics: Concepts, Theory And Application (ICAICTA), Penang, Malaysia, 2016, http://dx.doi.org/10.1109/ICAICTA.2016.7803094.
[22] C.R. Søndergaard, M.H.M. Olsson, M. Rostkowski, J.H. Jensen, Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values, J. Chem. Theory Comput. 7 (2011) 2284–2295.
[23] C.L. Stanton, K.N. Houk, Benchmarking pKa prediction methods for residues in proteins, J. Chem. Theory Comput. 4 (2008) 951–966.
[24] AMBER 12, D.A. Case, et al., University of California, San Francisco, 2012.
[25] J. Wang, P. Cieplak, P.A. Kollman, How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?, J Comput. Chem. 21 (2000) 1049–1074.
[26] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[27] Y. Mochizuki et al., Large-scale FMO-MP3 calculations on the surface proteins of influenza virus, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), Chem. Phys. Lett. 493 (2010) 346–352.
[28] I. Kurisaki et al., Visualization analysis of inter-fragment interaction energies of CRP-cAMP-DNA complex based on the fragment molecular orbital method, Biophys. Chem. 130 (2007) 1–9.
[29] A. Okamoto et al., Stable conformation of full-length amyloid-β (1–42) monomer in water: replica exchange molecular dynamics and ab initio molecular orbital simulations, Chem. Phys. Lett. 577 (2013) 131–137.
[30] S. Tanaka, C. Watanabe, Y. Okiyama, Statistical correction to effective interactions in the fragment molecular orbital method, Chem. Phys. Lett. 556 (2013) 272–277.
[31] A.T. Petkova et al., A structural model for Alzheimer's β-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (2002) 16742–16747.
[32] T. Luhrs et al., 3D structure of Alzheimer's amyloid-β(1–42) fibrils, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (2005) 17342–17347.
[33] A.T. Petkova, W.M. Yau, R. Tycko, Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β-amyloid fibrils, Biochemistry 45 (2006) 498–512.
[34] D. Thirumalai, D.K. Klimov, R.I. Dima, Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation, Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (2003) 146–159.
[35] S. Lovas, Y.L. Zhang, J.P. Yu, Y.L. Lyubchenko, Molecular mechanism of misfolding and aggregation of Aβ(13–23), J. Phys. Chem. B 117 (2013) 6175–6186.
[36] L.M. Hou et al., Solution NMR studies of the Aβ(1–40) and Aβ(1–42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 1992–2005.
[37] H. Ishimura et al., Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: *ab initio* molecular simulations, Chem. Phys. Lett. 633 (2015) 139–145.

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

Molecular dynamics and ab initio molecular orbital calculations on conformational change of amyloid-β monomers in an in vivo amyloid-β nonamer

*Shogo Tomioka, Haruki Sougawa, Hiromi Ishimura, Akisumi Okamoto, and Noriyuki Kurita**
*Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Aichi, 441-8580, Japan, * E-mail: kurita@cs.tut.ac.jp*

Sergiy Shulga, Pavel Karpov and Yaroslav Blume
Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a. Osypovskogo Str., Kyiv, 04123, Ukraine

***Abstract* —The accumulation of amyloid beta (Aβ) oligomers and fibrils in a brain is deeply involved as a major cause of the onset of Alzheimer's disease (AD). Recently, solid state NMR analysis for the tissues obtained from AD patient's brain has revealed that Aβ aggregates in the tissues have a single patient-specific structure with three-fold symmetry. However, the relationship between the structure of accumulated Aβs and its toxicity to AD patients has not been fully elucidated. This three-fold symmetry structure is markedly different from those of the *in vitro* Aβ fibrillar models. To clarify why this structure has significant stability, we here investigate the change in conformation of each Aβ peptide in the aggregates, using classical molecular dynamics (MD) simulations in water. Additionally *ab initio* fragment molecular orbital calculations are carried out for several structures obtained by the MD simulations to elucidate the specific interactions between Aβ peptides in the aggregates. The results simulated demonstrate that the interactions between the Aβ peptides which form stock the Aβ pairs are stronger than those between the Aβ peptides of trimers having three-fold symmetry in each layer. In addition, the charged amino-acid residues of Aβ peptide are found to contribute mainly to the significant stability of the Aβ aggregate.**

Keywords—fragment molecular orbital; molecular dynamics; Alzheimer's disease; aggregate; amyloid-beta

I. INTRODUCTION

The molecular etiological of Alzheimer's disease (AD) is involved by senile plaques accumulated in a patient brain[1-4]. The main component of the senile plaques was found to be amyloid-beta peptides (Aβs) [2, 5-9], which are produced from the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by two types of secretases [10-12]. The most abundant Aβs contained in the senile plaques are Aβ(1-40) and Aβ(1-42) peptides, each of which has 40 or 42 amino acid residues, respectively. Aβ(1-42) was found to aggregate more rapidly in diseased brains and comprise a major component of the senile plaques [13-16].

The accumulation of Aβ oligomers and fibrils in a brain has been recognized to be a major cause of the onset of AD. It is therefore expected that the inhibition of Aβ aggregations can prevent the onset of AD [6]. In fact, it was revealed that the inhibitions of the aggregations as well as the dissolution of Aβ oligomers are important for AD treatment [7]. Therefore, agents with strong binding affinity to Aβ are expected to inhibit the Aβ aggregation and be an intense inhibitor against the etiology of AD.

In the design of novel potent inhibitors against the Aβ aggregation, it is necessary to elucidate the structures of the Aβ oligomers and fibrils, and their aggregation mechanism. Lu *et al.* [17] revealed structural models for the *in vivo* Aβ nonamer, based on the solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) analyses for the Aβ fibrils obtained from the brains of two different AD patients. Each model has an identical and specific structure possessing three-fold symmetry with respect to the axis of fibril growth. These models are different from the models obtained for the *in vitro* Aβ fibrils [18], which indicate significant structural diversity. These illuminations of the structural features of Aβ fibrils are extremely helpful for structure-based medicine design for treating ADs. However, it is not elucidated why such high symmetry structure of Aβ fibrils can be stabilized.

Molecular simulations such as molecular mechanics (MM) and molecular dynamics (MD) ones for Aβ fibrils are efficient for investigating their stable structures and the mechanism of aggregation at an atomic level. Kahler *et al.* [19] performed a systematic computational research based on atomistic classical MD simulations for fibrillary Aβ oligomers and revealed that the pairs of Aβ proto-filaments are important as an initial seed for making Aβ fibrils. However, their MD simulations were not carried out for the Aβ fibrils with three-fold symmetry. In addition, they considered only Aβ(9-42) fragment, missing the residues of N-terminal region, which were found to be important for Aβ aggregation in the previous experiment [20].

In our previous studies [21, 22], replica-exchange MD (RE-MD) simulations were conducted in water for monomer and dimer models of Aβ(1-42) peptides and we searched widely for their stable conformations in water. In addition, we carried out *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations for the conformations obtained by the RE-MD simulations and determined the stable conformations of the solvated Aβ(1-42) monomer and dimer, with considering water molecules explicitly. We furthermore investigated the specific interactions between Aβ peptides in the Aβ hexamers at an electronic level, using *ab initio* FMO method [23]. From the results obtained by the above simulations, we elucidated the importance of structural water molecules for the stabilization of Aβ fibrils.

In the present study, we investigated the change in structure of the Aβ nonamer by use of classical MD simulations in water,

978-1-5386-3001-3/17/$31.00 ©2017 IEEE

in order to clarify the reason why the Aβ nonamer with three-fold symmetry obtained by Lu *et al.* [17] is stable. In addition, *ab initio* FMO calculations were conducted for structures obtained by the MD simulations. The results of our simulations reveal that the interactions between the Aβ peptides of stacked Aβ pairs make resultant contribution in stability of the Aβ nonamer.

II. Details of Molecular Simulations

We used the PDB structure (PDB ID: 2M4J) [17] obtained by the ssNMR analysis for an initial structure of the Aβ fibril model. This PDB file includes 20 models for the Aβ(1-40) nonamer, and each model is composed of three stacked layers of Aβ(1-40) trimer with three-fold symmetry. In our previous study [23], we built 20 models of Aβ(1-40) hexamer based on the PDB structures and determined the model 19 is the most stable based on the result of *ab initio* FMO calculations. Accordingly, we here employed the Aβ(1-40) nonamer structures of the model 19 as well as the model 1 in the PDB structures. The protonation states of histidine residues in the nonamer were assigned as Hip^{+} states. The N- and C-termini of each Aβ peptides were terminated by the uncharged acetyl and NH_2 groups, respectively, because the MM optimization for the Aβ(1-40) hexamer with the charged termini leads to a highly deformed structure. To consider properly the effect of solvation, the Aβ(1-40) nonamer was inserted in a water box, whose size is 1.5 times as the size of the nonamer.

We first optimized the structure of solvated Aβ(1-40) nonamer in the water box, using MM and MD simulation program package GROMACS Ver. 4.5.3[24]. Subsequently, as a first step of our study, 30 ns MD simulations were carried out in the water box at 300 K and 1 atm under the periodic boundary condition. In the MM and MD simulations, the AmberFF99SB [25] force field and TIP3P [26] model were assigned for Aβ residues and the water molecules, respectively. The van der Waals and the electrostatic interactions were evaluated by the Lenard-Jones function and the particle mesh Ewald method, respectively. In addition, the Nose-Hoover method was used for controlling the temperature of the solvated Aβ(1-40) nonamer during the MD simulations.

Finally, we picked up some snapshots of solvated Aβ(1-40) nonamers obtained by the MD simulations and investigated their electronic states by the ab initio FMO calculations, in which the water molecules being inside of 4 Å from the surface of nonamers were considered decidedly. Based on the total energies evaluated by the *ab initio* FMO calculations, the most stable conformation of the solvated Aβ(1-40) nonamer was determined, and the specific interactions between Aβ(1-40) peptides in the nonamer were analyzed at an electronic level based on the FMO results.

In the FMO calculations, a objective molecule is divided into units, each of which is called "fragment". The electronic states of the target molecule are estimated from the electronic states of the monomers and the dimers of the fragments. The particular interactions between the fragments can be revealed from the interaction energies calculated by the FMO calculation. In the present study, each water and each Aβ residue a molecule were assigned as a fragment. It is thus possible to evaluate the interaction energies between the Aβ residue and the solvating water molecule and between the residues. The *ab initio* MP2/6-31G method was used to accurately describe the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between the Aβ residues. We used the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [27] and investigated the inter fragment interaction energies (IFIE) [28], in order to elucidate which Aβ residues contribute to the stability of the Aβ nonamer at an electronic level.

III. Results and Discussion

A. *Change in structure of Aβ nonamer during MD simulation*

To make clear the chang in structure of solvated Aβ(1-40) nonamer, we first analyzed the root mean square deviation (RMSD) from the initial structure for each snapshot obtained by the MD simulation at 300 K. As shown in Figure 1, the RMSD for the model 1 suddenly increases from 7 up to 12 Å at around 16 ns, although RMSD is smaller than 7 Å before 15 ns. After 19 ns, RMSD is accompanied by an additional increase, indicating the instability of the model 1 against thermal fluctuation. In contrast, the RMSD of the model 19 is almost the same during the 30 ns MD simulaion. The value is around 7 Å, which is smaller than that of the model 1. Therefore, our preliminary 30 ns MD simulations reveal that the Aβ(1-40) nonamer of the model 19 is more stable against the thermal fluctuation than the model 1. Long-term MD simulations are underway now and the results will be published elsewhere.

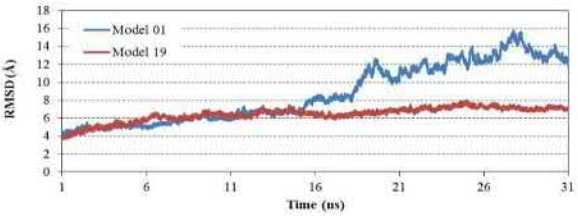


Figure 1 Change in RMSD for model 1 and 19 of Aβ(1-40) nonamer

To investigate conformational flexibility of Aβ(1-40) nonamer, we analyzed structural changes in model 1. Several snapshots of model 1 are presented in Figure 2. Before 8.8 ns, the nonamer keeps three-fold symmetry as shown in Figures 2a and 2b. However, at around 13.5 ns, the N-terminal domain of the trimer BEH, which is composed of three stacked monomers (B, E and H), starts separation from the turn-domain of the neighboring trimer CFI, as shown in Figures 2c and 2d. The separation increases markedly after 20 ns, resulting in the deformed structure without three-fold symmetry, as shown in Figures 2e and 2f. It is noted that RMSD increases rapidly at 19.567 ns (Figure 2e), while RMSD is the largest at 27.740 ns. As shown in Figure 2f, the N-terminal domain of the BEH trimer is completely separated from the other part of Aβ(1-40) nonamer, although the C-terminal and the turn domains of BEH keep the interactions with the other part. Accordingly, it is concluded that the N-

terminal domain of the BEH trimer in the model 1 of Aβ(1-40) nonamer is easily deformed by the thermal fluctuation.

On the other hand, the model 19 of Aβ(1-40) nonamer keeps three-fold symmetry even at 30 ns, as indicated in Figure 3. The N-terminal domain of the BEH trimer keeps contact with the other part of Aβ(1-40) nonamer. Figures 2 and 3 elucidate the conformational differences in solvated structures of the model 1 and the model 19 of Aβ(1-40) nonamer.

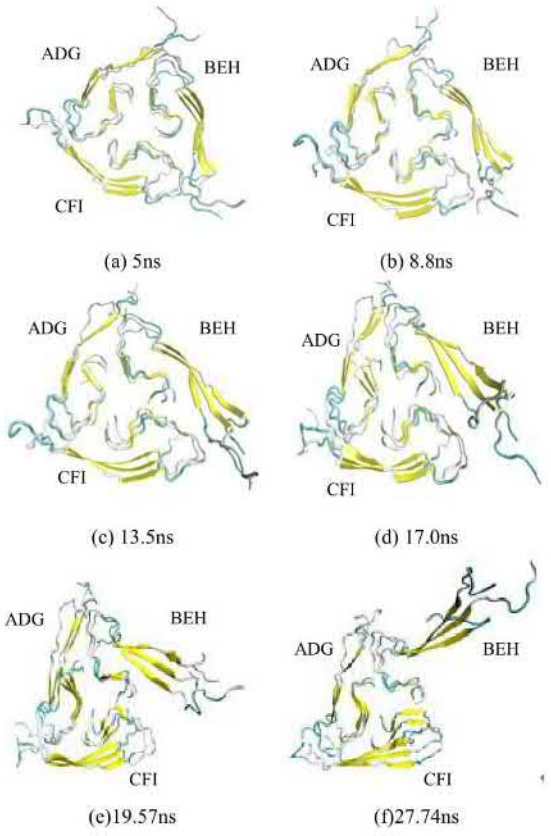


Figure 2 Change in structures for model 1 of Aβ(1-40) nonamer during 30 ns MD simulation in water



Figure 3 Structure of model 19 for Aβ(1-40) nonamer obtained by MD simulation in water; snapshot at 30 ns

To elucidate the reason why such large difference in structural change is caused between the models 1 and 19 of Aβ(1-40) nonamer, we compared the initial structures of these models. As shown in Figure 4b, the N-terminal domains of each monomer cover the turn-domains of the neiborghring monomers in the model 19 structure. It is thus expected that these N-terminal domains interact strongly with the turn-domains and are not easily deformed by the thermal fluctuation. In contrast, Figure 4a clearly indicates that the N-terminal domains in the model 1 structure project outward from the Aβ(1-40) nonamer. These domains vibrate freely during the MD simulation and can be easily deformed under thermal fluctuation. Consequently, the comparison of the initial structures of the models 1 and 19 (Figure 4) explains the reason of such significant conformational and stractural differences. Hereafter, we investigate the electronic states for the more stable model 19 structure of Aβ(1-40) nanomer.

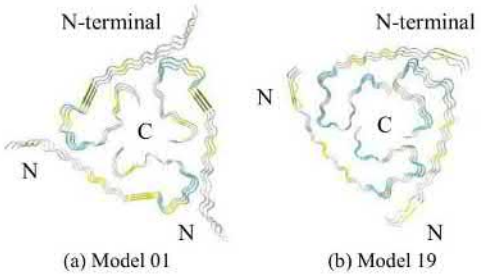


Figure 4 Structures of Aβ(1-40) nonamer for the models 1 and 19 with three-fold symmetry obtained by the present MM optimization in water

B. Determination of the most stable structure by FMO

To determine the stable structure of the model 19 of Aβ(1-40) nonamer, we picked up some snapshots obtained by the MD simulation. Figure 5 shows the change in potential energy of the model 19 during the MD simulation in water. We here picked up three most stable structures at 17.634, 29.989 and 29.363 ns and optimized these structures by the MM method in water. To determine the most stable structure among these optimized ones, we evaluated accurately their total energies in water by use of the *ab initio* FMO method. The results are compared with that for the initial structure in Table 1.

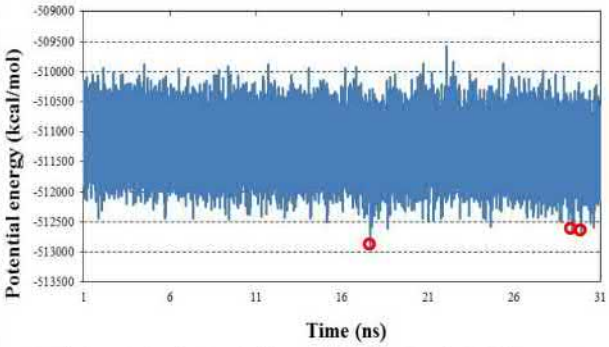


Figure 5 Change in potential energy for model 19 of Aβ(1-40) nonamer obtained by MD simulation

As listed in Table 1, the MM optimized structure of the snapshot at 29.928 ns is at least 273 kcal/mol more stable than the other optimized structures. We analyzed the interaction energies (IEs) between Aβ residues, between Aβ residues and water molecules, and between water molecules to elucidate the origin for this stability. The IEs between Aβ residues are almost the same for both the structures at 29.363 and 29.928 ns, so that these values are not related with the trend of the TEs of these structures. Also, the IEs between Aβ residues and water molecules cannot explain the trend of the TEs. On the other hand, the trend of the IEs between water molecules is consistent with the trend of the TEs for the solvated structures. Consequently it is revealed from Table 1 that the relative stability of the solvated Aβ(1-40) nonamer is mainly determined by the relative stability of water molecules around the Aβ(1-40) nonamer. This fact is the same as those obtained for the solvated Aβ monomer [22] and hexamer [23] in our previous FMO calculations.

Table 1 Total energies (TE) and interaction energies (IE: kcal/mol) for the Aβ(1-40) nonamer structures obtained by the MD and MM simulations in water; the relative values to that for the most stable structure are listed.

Structure	ΔTE	Aβ residues ΔIE	Aβ and waters ΔIE	Waters ΔIE
0.000 ns	1437.4	679.5	2604.4	2022.3
17.634 ns	320.4	261.8	-494.1	569.1
29.363 ns	273.0	0.6	-156.2	380.4
29.928 ns	0.0	0.0	0.0	0.0

C. Interaction energies between Aβ monomers in Aβ nonamer

The specific interactions between Aβ peptides in the solvated Aβ nonamers were investigated to elucidate which interactions contribute mainly to the stability of the Aβ nonamer having three-fold symmetry. Table 2 lists the IEs between Aβ peptides in the most stable structure of Aβ nonamer. The IEs between the peptides of the Aβ pairs (A-D, B-E, C-F, D-G, E-H and F-I) are significantly large compared with the other IEs. These pairs are made between the stacked peptides of the neighboring layers. In particular, the IE between the C and F peptides is the largest (−398.5 kcal/mol). In contrast, the IEs between the peptides of the trimers having three-fold symmetry in the same layer are at largest −100.0 kcal/mol for the D-E pair, as listed in Table 2. These values are significantly smaller than those for the stacked Aβ pairs.

Therefore, Table 2 elucidates that the interactions between the peptides of the stacked Aβ pairs contribute mainly to the stability of the Aβ nonamer with the three-fold symmetry.

The above mentioned results for the Aβ nonamer are similar to those for the Aβ hexamers evaluated in our previous study [23]. It should be noted that the size of attractive IEs is larger for the Aβ nonamer in comparison with that for the Aβ hexamer. Accordingly, as increasing the number of stacked layers of Aβ trimers with the three-fold symmetry, the attractive interactions between the layers become more enhanced. It is thus expected from the view point of energy that the formation of stacked pair, trimer or tetramer prefers to occur more frequently at the initial stage of the Aβ aggregations.

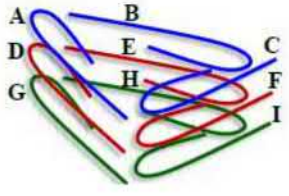
D. Specific interactions between paired Aβ(1-40) monomers

To elucidate the reason why the interactions between the paired monomers (C and F) of the Aβ(1-40) nonamer are so strong, we investigated the IFIEs between the amino acid residues of these monomers. Figure 6 shows the IFIE map evaluated by FMO, where attractive and repulsive interactions are shown in blue and red, respectively. In particular, the attractive interactions are strong between Arg5(C) and Glu3(F), between His13(C) and Glu11(F), and between Asp7(C) and Arg5(F). As listed in Table 3, these attractive IFIEs are larger than 80 kcal/mol, indicating that these strong attractive interactions between the charged residues are the main reason for the strong interactions between the monomers C and F in the Aβ(1-40) nonamer.

Furthermore, we analyzed the interacting structures of these amino acid residues to reveal the specific interactions between them. As shown in Figure 7, all pairs are formed between the charged residues of the neighboring Aβ(1-40) monomers. The side chain of the positively charged residue interacts attractively with that of the negatively charged one by the electrostatic interactions, resulting in some hydrogen bonds between the side chains. It is noted that Glu3, Arg5 and Asp7 are included in the N-terminal domain of Aβ(1-40) monomer, and that they were not considered in the previous MD simulations by Kahler *et al.*[19]. Therefore, our present molecular simulations clarify the importance of these residues for the stability of the Aβ(1-40) nonamer for the first time. It is thus concluded that these N-terminal residues should be considered in the molecular simulations for Aβ aggregates such as the Aβ(1-40) nonamer.

Table 2 Interaction energies (kcal/mol) between monomers of Aβ(1-40) nonamer for the most stable structure decided by FMO calculations

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



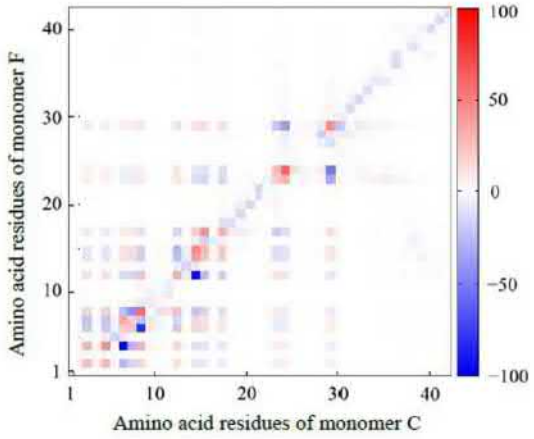
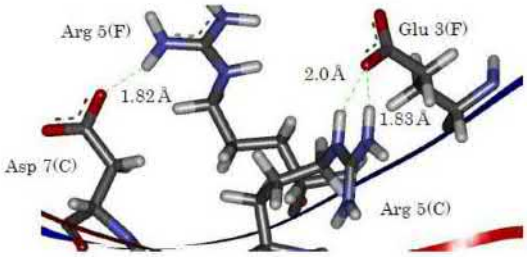


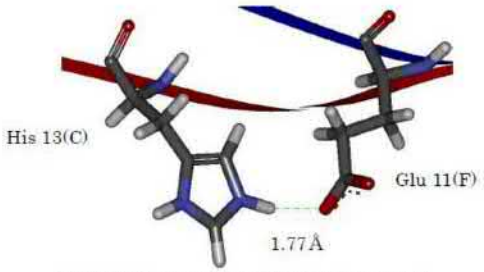
Figure 6 IFIEs between the residues of monomers C and F for the most stable structure of Aβ(1-40) nonamer

Table 3 Amino acid pairs whose attractive IFIE is more than 80kcal/mol

Residue of C	Residue of F	IFIE
Arg 5	Glu 3	-103.54
His 13	Glu 11	-96.53
Asp 7	Arg 5	-82.56



(a) Arg5 and Asp7 of monomer C and Glu3 and Arg5 of monomer F



(b) His13 of monomer C and Glu11 of monomer F

Figure 7 Interacting structures between residues of monomers C and F

E. Proposal of model for Aβ aggregation mechanism

It is necessary to elucidate the structures of the Aβ aggregates and their aggregation mechanism for designing potent inhibitors against the Aβ aggregation. From the results obtained by our present FMO calculations, it was found that the interactions between the Aβ peptides of the stacked pairs contribute mainly to the stability of the Aβ nonamer. Based on the results, the following hypothetical model for the Aβ aggregation steps for making the structure with three-fold symmetry are proposed.

(1) Aβ monomers are stacked to form a pair, and other monomers are additionally stacked to make larger stacked aggregates such as Aβ trimer and tetramer.

(2) In the stacked Aβ aggregates, electronic charge is distributed on the charged amino acid residues exiting at the N-terminal and the turn domains.

(3) By the electrostatic interactions between the charged parts of the stacked aggregates, some stacked Aβ aggregates come close to each other and form a larger Aβ aggregate with three-fold symmetry.

The interaction energies established by the present FMO calculations elucidate that the opposite mechanism, in which Aβ trimers with three-fold symmetry are formed at first and they are stacked to make hexamer or nonamer, is not expected to occur.

If the above model is realistic, the agents inhibiting the step (3) are likely to be effective for inhibiting the Aβ aggregations. For example, the drugs with specific binding to the charged amino acid residues of the stacked Aβ aggregate are expected to inhibit the formation of larger Aβ aggregates by reducing the electrostatic interactions between the charged residues of the stacked aggregates.

IV. CONCLUSIONS

In the present study, we investigated the change in structure of the Aβ(1-40) nonamer with three-fold symmetry by classical MD simulations and elucidated the specific interactions between the peptides in the nonamer by *ab initio* FMO calculations, considering water molecules explicitly. The results are summarized as follows.

1. The specific interactions between the N-terminal domain of Aβ peptide and the turn domain of the neighboring peptide in the Aβ nonamer are important for keeping the three-fold symmetry of the Aβ nonamer.

2. The stability of the solvated Aβ nonamer depends significantly on the stability of the solvating water molecules associated with the nonamer.

3. The interactions between the peptides of the stacked Aβ pairs are stronger than those between the peptides of the Aβ trimers with three-fold symmetry.

It is therefore expected that the agents for inhibiting the aggregations of stacked Aβ fibrils can be effective against ADs.

REFERENCES

[1] Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., He, K., Melnikova, T., Wen, T., Chiang, H.-C., Xu, G., Koliatsos, V. E., Borchelt, D. R., Price, D. L., Lee, H.-K. & Wong, H.-K., BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. J. Neurosci. 25 (2005) 11693–11709.

[2] Selkoe, D. J., Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol. Rev. 81 (2001) 741–766.

[3] Rak, M., Bigio, M. R. D., Mai, S., Westaway, D. & Gough, K., Dense-core and diffuse Aβ plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy. Biopolymers 87 (2007) 207–217.

[4] Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos Jr., L., Younkin, L. H., Suzuki, N. & Younkin, S. G., Amyloid-β protein (Aβ) in Alzheimer's disease brain. J. Biol. Chem. 270 (1995) 7013–7016.

[5] Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E. & Ball, M. J., β-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993) 10836–10840.

[6] Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury Jr., P. T., The carboxy terminus of the β-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Biochemistry 32 (1993) 4693–4697.

[7] Findeis, M. A., The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. Pharmacol. Ther. 116 (2007) 266–286.

[8] Pimplikar, S. W., Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41 (2008) 1261–1268.

[9] Tycko, R., Characterization of amyloid structures at the molecular level by solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. Methods Enzymol. 413 (2006) 103–122.

[10] Tycko, R., Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid state NMR. Q. Rev. Biophys. 39 (2006) 1–55.

[11] Balbach, J. J., Petkova, A. T., Oyler, N. A., Antzutkin, O. N., Gordon, D. J., Meredith, S. C. & Tycko, R., Supramolecular structure in full-length Alzheimer's β-amyloid fibrils: evidence for a parallel betasheet organization from solid-state nuclear magnetic resonance. Biophys. J. 83 (2002) 1205–1216.

[12] Benzinger, T. L., Gregory, D. M., Burkoth, T. S., Miller-Auer, H., Lynn, D. G., Botto, R. E. & Meredith, S. C., Propagating structure of Alzheimer's β-amyloid(10-35) is parallel β-sheet with residues in exact register. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (1998) 13407–13412.

[13] Tycko, R., Sciarretta, K. L., Orgel, J. & Meredith, S. C., Evidence for novel β-sheet structures in Iowa mutant β-amyloid fibrils. Biochemistry 48 (2009) 6072–6084.

[14] Qiang, W., Yau, W. M., Luo, Y., Mattson, M. P. & Tycko, R., Antiparallel β-sheet architecture in Iowa-mutant β-amyloid fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109 (2012) 4443–4448.

[15] Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P. G., Rebeck, G. W. & Greenberg, S. M., Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. Annals of Neurology 49 (2001) 697–705.

[16] van Nostrand, W., Melchor, J. P., Cho, H. S., Greenberg, S. M. & Rebeck, G. W., Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid β-protein. J. Biol. Chem. 276 (2001) 32860–32866.

[17] Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., & Tycko R., Molecular structure of β-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. Cell 154 (2013) 1257–1268.

[18] R. Tycko, Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils, Protein Sci. 23 (2014) 1528–1539.

[19] Kahler, A., Sticht, H., & Horn, A. H. C., Conformational stability of fibrillar amyloid-beta oligomers via protofilament pair formation – a systematic computational study. Plos One 8 (2013) e70521.

[20] Bitan, G., Vollers, S. S., & Teplow., D. B., Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid β-protein oligomerization. J. Biol. Chem. 278 (2003) 34882–34889

[21] Yano, A., Okamoto, A., Nomura, K., Higai S., & Kurita, N., Difference in dimer conformation between amyloid-b(1–42) and (1–43) proteins: Replica exchange molecular dynamics simulations in water. Chem. Phys. Lett. 595–596 (2014) 242–249

[22] Okamoto, A, Nomura, K., Yano, A., Higai, S., Kondo, T., Kamba, S., & Kurita, N., Stable conformation of full-length amyloid-b (1–42) monomer in water:Replica exchange molecular dynamics and ab initio molecular orbital simulations. Chem. Phys. Lett. 577 (2013) 131–137.

[23] Ishimura, H., Tomioka, S., Kadoya, R., Simamura, K., Okamoto, A., Shulga, S., & Kurita, N., Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: Ab initio fragment molecular orbital calculations in water. Chem. Phys. Lett. 672 (2017) 13–20.

[24] Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C., GROMACS: Fast, flexible, and free. J. Comput. Chem. 26 (2005) 1701–1718.

[25] Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C., Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. Proteins: Structure Function and Bioinformatics 65 (2006) 712–725.

[26] Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys, 79 (1983) 926–935.

[27] Mochizuki, Y., Yamashita, K., Nakano, T., Okiyama, Y., Fukuzawa, K., Taguchi, N. & Tanaka, S., Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, *Theor. Chem. Acc.*, 130 (2011) 515–530.

[28] Fukuzawa, K., Nakano, T., Kato, A., Mochizuki, Y., & Tanaka, S., Applications of the fragment molecular orbital method for bio-macromolecules, *J. Comp. Chem.*, 6 (2007) 185–198.

4.3 Специфічні взаємодії та конформаційні зміни β-амілоїдних мономерів в β-амілоїдних фібрилах

Ab initio fragment molecular orbital calculations on the specific interactions between amyloid-β peptides in an in vivo amyloid-β fibril

*Hiromi Ishimura, Ryushi Kadoya, Kanako Shimamura, Shintarou Ota, Mitsuki Fujimori, Akisumi Okamoto, and Noriyuki Kurita**
*Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, 441-8580, Japan, * E-mail: kurita@cs.tut.ac.jp*

Sergiy Shulga
Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a. Osypovskogo Str., Kyiv-123, 04123, Ukraine
E-mail: Shulga5@i.ua

***Abstract* — The accumulation of amyloid-beta (Aβ) fibrils in a brain has been recognized to contribute to the onset of Alzheimer's disease (AD). However, the relation between the structure of the aggregate and its toxicity to AD patients remains to be fully elucidated. A recent solid-state NMR analysis for the tissue obtained from the brains of AD patients revealed that the Aβ aggregates have only a single structure with three-fold symmetry. We here investigate the specific interactions between Aβ peptides in the aggregate, using *ab initio* fragment molecular orbital calculations, to explain why such a unique structure possesses significant stability. The results indicate that the interactions between the Aβ peptides of the stacked Aβ pair are stronger than those between the Aβ peptides of the trimer with three-fold symmetry. Furthermore, it is elucidated that the charged amino-acid residues of Aβ mainly contribute to the strong attractive interactions between the paired Aβ peptides.**

Keywords—molecular simulation; fragment molecular orbital; Alzheimer's disease; amyloyd-beta; aggregate

I. Introduction

Aggregations of amyloid-beta peptides (Aβs) have been considered to play a key role in the mechanism of the molecular pathogenesis of Alzheimer's disease (AD), which is accompanied by senile plaques comprised of Aβs in a diseased brain [1]. Aβs with a variety of lengths are produced from the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by both β- and γ-secretases [2]. The most abundant Aβs contained in the senile plaques are Aβ40 and Aβ42 [2, 3], each of which has 40 or 42 amino acid residues, respectively. Aβ42 was found to aggregate more rapidly and comprise a major component of the senile plaques in the diseased brain [4–6]. These plaques cause the death of neuronal cells in the brain [7], leading to the onset of AD.

Since Aβs have several hydrophobic amino acid residues, Aβs can form strong aggregates in water due to the hydrophobic interactions between these residues, leading to a formation of Aβ fibrils [8]. In fact, intermolecular contacts within the two β-sheet regions of the neighboring Aβs contribute to stabilizing the Aβ aggregates. It is thus expected that compounds having a strong binding affinity to Aβ can inhibit Aβ aggregation and be a potent inhibitor against the pathogenesis of AD [9, 10].

For the structure-based design of inhibitors against the Aβ aggregation, it is indispensable to make clear the structure of the Aβ fibrils as well as the mechanism of the aggregation. Recently, Lu *et al.* [11] revealed a novel structural model for the *in vivo* Aβ fibrils, based on the solid-state NMR (ssNMR) analyses for the Aβ fibrils derived from the brains of two different AD patients. Each of these *in vivo* Aβ fibrils has a single and patient-specific structure possessing three-fold symmetry with respect to the axis of fibril growth. This model is profoundly different from the models for the *in vitro* Aβ fibrils [12] showing significant structural diversity. The illumination of these *in vivo* structural insights for the Aβ fibrils is quite useful for the structure-based drug design of AD.

Kahler *et al.* [13] has recently conducted a systematic computational study based on all-atom classical molecular dynamics (MD) simulations for many types of fibrillary Aβ oligomers and concluded that the pairs of Aβ protofilaments are important as a seed for forming Aβ fibrils. In addition, enhanced MD simulations [14] were used to investigate the factors that modulate the stability of the *in vivo* Aβ fibrils [11] with three-fold symmetry, and it was found that the fibrils lack of the polymorphism detected for the *in vitro* fibrils [12].

Although classical MD simulations are very powerful tools for investigating the structural change of biomolecules, the results depend on the force fields employed in the simulation. On the other hand, *ab initio* molecular orbital (MO) calculations employ no parameters and can analyze the properties of molecules at an electronic level. Since the conventional *ab initio* MO calculations for large molecules require a large amount of computation time and computer processing facility, it is not practical to apply these MO methods for large molecules. In contrast, the fragment MO (FMO) method, which was developed by Kitaura *et al.* [15, 16], can obtain the electronic states of biomolecules in a realistic computational time.

In the present study, we investigate the specific interactions between the Aβ monomers in the *in vivo* Aβ fibril [14], in order to elucidate the main factor for the stability of this unique fibril structure, using *ab initio* FMO [15–18] calculations. In addition, based on the electronic properties evaluated by the FMO calculations, we highlighted the key amino acid residues of Aβ, which contribute significantly to the formation of the

978-1-5090-1636-5/16/$31.00 ©2016 IEEE

fibril. The results may prove essential for revealing the structures of the Aβ fibrils and the mechanism of Aβ aggregation in the brains of AD patients.

II. Details of *ab initio* Molecular Simulations

As an initial structure of *in vivo* Aβ fibril model, we here employed the PDB structure (PDB ID: 2M4J) obtained by the ssNMR analysis for a Aβ fibril derived from the brain of an AD patient [12]. This PDB file contains 20 models for a Aβ40 nonamer, and each model consists of three stacked layers of an Aβ40 trimer with three-fold symmetry. We employed the model 1 structure in the PDB file. Since the size of the solvated Aβ40 nonamer is so large for *ab initio* FMO calculations, we made two types of hexamer models, each of which is built of the first and the second layers or the second and the third layers of the Aβ40 nonamer, respectively, as a first step of our *ab initio* molecular simulations. These models are the smallest ones for elucidating which interaction between Aβ40 monomers in the trimer or between those of the stacked Aβ40 pair is more significantly involved in the stabilization of this fibril structure. The N- and C-terminals of Aβ40 were terminated by the uncharged acetyl and NH_2 groups, respectively, and we did not consider the counter ions around the terminals, because the positions of the ions are not determined by the ssNMR analysis.

Aβ40 has three His residues. To determine their protonated states, we evaluated the pKa values for each His residues by use of the PROPKA 3.1 [19, 20]. All of three His residues have the pKa values larger than 6, so that their protonations are assigned as Hip^+. To consider the solvation effect on the Aβ fibril properly, we added water molecules within a 6 Å layer around the fibril and optimized the positions of the hydrogen atoms as well as the solvating water molecules, with fixing the positions of heavy atoms of Aβ fibril, by use of the classical molecular mechanics (MM) and MD simulation program AMBER12 [21]. In the MM optimization, the AMBER99SB [22] and TIP3P [23] force fields were assigned for the Aβ residues and the water molecules, respectively. It is noted that we fixed the positions of the heavy atoms of Aβ, because our preliminary full optimization of the solvated Aβ hexamer by AMBER12 caused a significant change in the hexamer structure.

The electronic properties for the solvated Aβ hexamers were investigated by the *ab initio* FMO calculations, in order to determine which structure of Aβ hexamers is more stable and highlight which amino acid residues of Aβ monomer are important for stabilizing the Aβ hexamer structure with three-fold symmetry. In principle, the structure should be optimized by the same *ab initio* FMO method. However, because the *ab initio* optimization is impracticable for the solvated Aβ hexamers, we employed the structure extracted from the PDB structure with solvating water molecules, whose positions are optimized by the classical MM method of AMBER12.

In the FMO calculations, the target molecule is divided into units called "fragment", and the electronic properties of the target molecule are estimated from the electronic properties of the monomers and the dimers of the fragments. The specific interactions between the fragments can be investigated from the interaction energies obtained by the FMO calculation. In the present FMO calculations, the water molecules existing within a 6 Å distance from the hexamer surface were considered explicitly. Each Aβ residue and each water molecule were assigned as a fragment, because this fragmentation enables us to evaluate the interaction energies between the Aβ residues and between the residue and the solvating water molecules. The *ab initio* MP2/6-31G method was employed to investigate accurately the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between the Aβ residues. The FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [24] was used. In addition, to elucidate which residues of Aβ contribute to the stability of the hexamer conformation, we investigated the specific interactions between the fragments by the FMO method at an electronic level.

III. Results and Discussion

A. *Stable structure of Aβ hexamer in water*

Based on the PDB structure of Aβ40 nonamer (PDB ID: 2M4J) obtained by the ssNMR analysis for the *in vivo* Aβ fibril, we constructed two models of the Aβ hexamer. The first one called a upper hexamer is made of the first and the second layers of the nonamer, while the second one called a lower hexamer is made of the second and the third layers. These hexamers are the smallest models for investigating which interaction between Aβ monomers in the trimer or between those of the stacked pairs is more significantly involved in the stabilization of the nonamer. In the upper hexamer, the monomers A and D, C and F, and B and E make pairs respectively, and a large number of water molecules are stabilized between these Aβ pairs as well as in the central cavity of the hexamer. Some of these water molecules play an essential role in the specific interactions between the charged residues of Aβ, as will be described in the next subsection. A similar structure was obtained for the lower hexamer.

In the both hexamers, the side chains of the charged residues Asp23 and Lys28 form a salt bridge in each of the six monomers, leading to the densely packed structure of the Aβ hexamer with three-fold symmetry. This result is consistent with those obtained by the ssNMR and the classical MD simulations. It is also elucidated from the trimer structure in the same layer that the N-terminal Ser8 of each Aβ monomer forms hydrogen bonds with both Ser26 and Asn27 of the turn-domain of the neighboring Aβ monomer. These specific hydrogen bonds contribute significantly to the stabilization of the trimer with three-fold symmetry.

In order to determine which hexamer is more stable, we investigated the total energies of the two hexamers by use of *ab initio* MP2/6-31G calculations of FMO. It should be noted that the water molecules existing within 6 Å from the surface of the hexamer were considered explicitly. The number of water molecules was combined to be 1219 for the two hexamers. The results revealed that the lower hexamer is 257 kcal/mol more stable than the upper hexamer. To clarify the reason for the difference in stability between the two hexamers, we moreover investigated the interaction energies (IEs) between Aβ monomers, between monomers and waters, and between waters. As listed in Table 1, the IE between Aβ monomers has

only 35 kcal/mol difference between the two hexamers. In contrast, the IEs between Aβ and waters and between waters have 63 and 79 kcal/mol difference, respectively. Therefore, it is concluded that the stability of the solvated Aβ hexamer comes significantly from the solvating water molecules. This result is similar to that for the solvated Aβ monomer obtained by our molecular simulations [25] based on the replica-exchange MD and *ab initio* FMO methods.

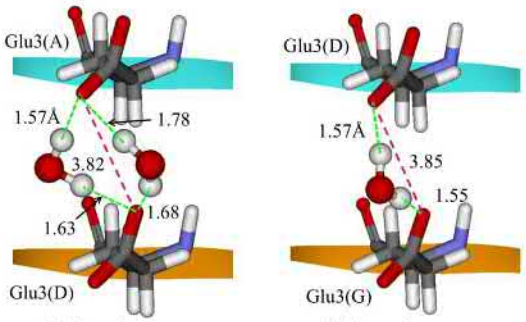
TABLE 1. Total energies (TEs: kcal/mol) of Aβ hexamers and interaction energies (IEs: kcal/mol) between Aβ monomers, Aβ and waters, and waters in the solvated Aβ hexamers evaluated by MP2/6-31G method of FMO

Hexamer	TE	ΔTE	IEs		
			Aβs	Aβs–waters	Waters
Upper	−115987983.0	256.9	−3166.7	−13990.0	−17053.9
Lower	−115988239.8	0.0	−3201.2	−14052.4	−17133.1

To clarify the reason why the lower hexamer is more stable than the upper one, we investigated in detail the interaction energies between the residues of each monomer for the both hexamers, using the *ab initio* FMO method. The overall trends of the interaction energies for the both hexamers were found to be similar to each other. Table 2 lists the paired residues and their interaction energies, for which the energy is significantly different between the two hexamers. The salt bridge between Asp23 and Lys28 in each monomer is found to be stronger for the lower hexamer. In addition, the repulsive interactions between the same charged residues (Glu3 and Glu22) of the paired monomers are weaker for the lower hexamer. In fact, Table 2 indicates the large repulsive interactions between Glu3 residues and between Glu22 residues of the paired monomers. Generally, these same charged residues cannot exist close to each other, due to the repulsive electrostatic interaction between them. However, as shown in Fig. 1, one or two water molecules bridge between the side chains of these residues by hydrogen bonding and bring them closer to each other. In the lower hexamer, one specific water molecule is hydrogen bonded to both Glu3 residues of the monomers D and G, as shown in Fig. 1b, leading to a stable conformation of these residues. On the other hand, the upper hexamer has two specific water molecules as shown in Fig. 1a, which bridge the Glu3 residues and bring them closer to each other. As a result, the two Glu3 residues in the upper hexamer come closer to each other, and the repulsive interaction between them becomes stronger in comparison of that for the lower hexamer. In fact, the interaction energy between the Glu3 residues is 57.4 (upper) and 53.6 (lower) kcal/mol, respectively. The similar bridging structure by water molecules arises between the Glu22 residues of the paired monomers.

TABLE 2. Difference in interaction energy (IE: kcal/mol) between Aβ residues for the two types of Aβ hexamers

Amino acid pair of upper hexamer	IE	Amino acid pair of lower hexamer	IE	ΔIE
Asp23(C) - Lys28(C)	−117.2	Asp23(F) - Lys28(F)	−123.2	6.1
Glu11(B) - His13(B)	−73.6	Glu11(E) - His13(E)	−78.2	4.6
Asp23(A) - Lys28(A)	−116.4	Asp23(D) - Lys28(D)	−120.6	4.2
Glu3(A) - Glu3(D)	57.4	Glu3(D) - Glu3(G)	53.6	3.7
Glu22(A) - Glu22(D)	64.6	Glu22(D) - Glu22(G)	60.9	3.7



(a) Upper hexamer (b) Lower hexamer

Figure 1. Interacting structures between Glu3 residues of the neighboring monomers bridged by water molecules in the solvated (a) upper and (b) lower hexamers.

As described above, there is a possibility that water molecules significantly contribute to the stabilization between the monomers in the Aβ hexamer, and that the difference of hydrogen bonding conformation of water molecules creates the significant difference in stability of the hexamer. Accordingly, we conclude that it is indispensable to consider water molecules explicitly for investigating the stable structures of Aβ hexamer as well as other Aβ aggregates. In addition, it is expected that the aggregation mechanism of Aβ monomers is remarkably affected by water molecules existing between the monomers.

B. Specific interactions between Aβs in the Aβ hexamer

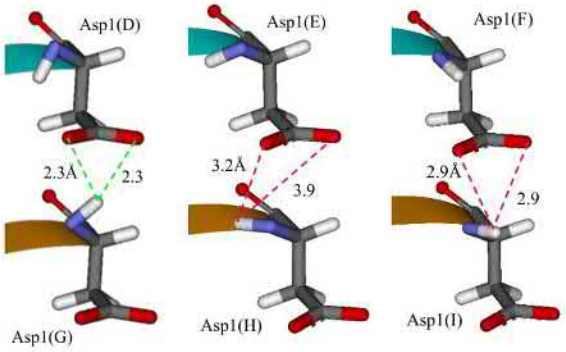
In the previous subsection, the lower hexamer was found to be more stable than the upper hexamer. We thus investigated specific interactions between Aβ monomers for the lower hexamer in what follows.

To reveal which interactions between monomers in the hexamer are more important for the stabilization of the hexamer, we evaluated the IEs between monomers for the solvated Aβ hexamer by use of the *ab initio* FMO method. As indicated in Table 3, the IEs between the monomers of the trimer formed in the same layer are at largest −73 kcal/mol. In contrast, the IEs between the monomers of the stacked Aβ pairs between the two layers are in a range between −87 and −105 kcal/mol. This result demonstrates that the interactions between the monomers of the stacked pairs in the hexamer contribute more significantly to the hexamer stability than those between the monomers of the trimers. The same result is obtained for the upper hexamer.

TABLE 3. Interaction energies (kcal/mol) between Aβ monomers (from D to I) in the lower hexamer evaluated by MP2/6-31G method of FMO

		Layer 1			Layer 2		
		D	E	F	G	H	I
Layer 1	D	–	–	–	–	–	–
	E	−71.2	–	–	–	–	–
	F	−70.8	−73.0	–	–	–	–
Layer 2	G	−105.0	−25.0	−14.4	–	–	–
	H	−15.6	−87.0	−25.5	−69.1	–	–
	I	−25.0	−14.7	−91.4	−64.3	−68.9	–

Table 3 also indicates that the IE between the stacked monomers D and G is the largest (−105 kcal/mol) and at least 14 kcal/mol larger than the IEs for the other pairs such as E−H and F−I pairs. To clarify the reason for this large IE between the monomers D and G, we investigated the IEs between each of the residues of these monomers to find that the repulsive interaction between the Asp1 residues of the D−G pair is weaker than those for the E−H and the F−I pairs. The IEs are evaluated to be 41.0 kcal/mol, which is significantly smaller than those (55.0 and 64.5 kcal/mol) for the E−H and F−I pairs. Therefore, we conclude that the difference in interaction energy between the Asp1 residues of the two paired monomers is the main reason why the IE between the monomers D and G is more attractive than those between the monomers E and H. In fact, as shown in Fig. 2a, there are weak hydrogen bonds between the Asp1 residues of the monomers D and G, while there is no hydrogen bond between the monomers E and H as well as between the monomers F and I as shown in Fig. 2b and 2c. This difference in the interaction between the Asp1 residues is expected to be the main reason why the IE between the monomers D and G is the largest.



(a) Monomer D and G (b) Monomer E and H (c) Monomer F and I

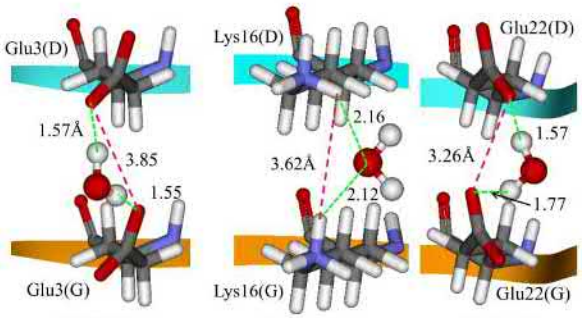
Figure 2. Interacting structures between Asp1 residues of (a) monomers D and G, (b) monomers E and H, and (c) monomers F and I.

We furthermore investigated the specific interactions between the monomers D and G, in order to highlight the important residues for the strong interaction between them. Table 4 lists the pairs of the residues and the IEs between them, whose size of IE is larger than 50 kcal/mol. It should be noted that all residues contributing to the strong interactions are charged ones. There are strong attractive interactions between Lys28(D) and Asp23(G), between Asp7(D) and Arg5(G), and between Asp23(D) and Lys28(G). It is well known that Asp23 and Lys28 form the salt bridge in an Aβ monomer and determine the monomer conformation. Accordingly, our present FMO calculations elucidate for the first time that the charged residues Asp23 and Lys28 contribute to not only the monomer conformation but the stability between the stacked Aβ monomers in the hexamer.

On the other hand, Table 4 also highlights that there are eight pairs of residues whose repulsive interaction energy is larger than 50 kcal/mol. This number is larger than that with large attractive interactions listed in Table 4. All of the repulsive interactions are caused between the same charged residues of the paired monomers D and G. It is thus likely that the electrostatic interactions between these residues are the main reason for the large repulsive interactions. To elucidate the reason why the same charged residues come closer to each other, we analyzed the structure around the residues. As shown in Fig. 3, there is a unique water molecule bridging between the side chains of the residues (Glu3, Lys16 and Glu22) by strong hydrogen-bonds. As a result, the negatively charged groups of the Glu3 and Glu22 residues can exist close to each other. In a similar way, the positively charged groups of the Lys16 residues come close to each other as shown in Fig. 3b. Our current *ab initio* FMO calculations considering the solvating water molecules explicitly demonstrate for the first time that the water molecules become deeply engaged in the interactions between the residues of the paired Aβ monomers in the hexamer.

TABLE 4. Interaction energies (IE: kcal/mol) between Aβ residues of the monomers D and G in the lower hexamer evaluated by FMO

Monomer D	Monomer G	IE
Lys28+	Asp23−	−54.9
Asp7−	Arg5+	−54.5
Asp23−	Lys28+	−52.0
Asp7−	Asp7−	62.5
Glu22−	Glu22−	60.9
Arg5+	Arg5+	57.1
Lys28+	Lys28+	56.4
Glu11−	Glu11−	56.4
Lys16+	Lys16+	56.1
Glu3−	Glu3−	53.6
His6+	His6+	50.9



(a) Glu3 (b) Lys16 (c) Glu22

Figure 3. Interacting structures between the same residues of the monomers D and G bridged by water molecules; (a) Glu3, (b) Lys16, and (c) Glu22.

In the lower hexamer, the monomers E and H, and the monomers F and I are stacked to form a pair in the same conformation as the monomers D and G. As a result, the similar strong attractive interactions are created in the E−H and the F−I pairs, as indicated in Table 3. These interactions contribute significantly to the stabilization of the pairs as well as the hexamer as a whole. We thus investigated the specific interactions between the residues for these pairs to obtain the similar results as that for the D−G pair.

Next, we investigated the specific interactions between the monomers existing in the same layer, to reveal the stability of the Aβ trimer with three-fold symmetry. As indicated in Table 3, the interaction energy between the monomers E and F in the

layer-1 is the largest. We thus investigated in detail the specific interactions between the residues of the monomers E and F. Table 5 lists the pairs of the residues and the IEs between them, whose size of IE is larger than 20 kcal/mol. The interactions between Glu22(E) and Arg5(F), between Asp23(E) and Arg5(F), between Lys28(E) and Asp7(F) are found to be significantly attractive. These strong attractive interactions are caused by the hydrogen-bonding network bridged by water molecules as well as the electrostatic interactions between the charged groups (COO^- and NH_2^+) of the sidechains of the charged residues. As shown in Fig. 4, two unique water molecules form a hydrogen-bond network between the sidechains of Glu22(E) and Arg5(F), leading to the short (5.1 Å) distance between the charged groups of these residues. As a result, there is a strong attractive interaction between these residues as listed in Table 5. In addition, the charged groups of Arg5(F) interacts with the COO^- group of Asp23(E) at 8.1 Å distance. There is also an attractive interaction between the charged groups of Lys28(E) and Asp7(F), as shown in Fig. 4. It is thus concluded that the strong attractive interaction between the monomers E and F comes from the hydrogen-bonding network bridged by water molecules as well as the electrostatic interactions between the charged groups of the residues with the opposite signed charges.

TABLE 5. Interaction energies (IE: kcal/mol) between Aβ residues of the monomers E and F in the lower hexamer evaluated by FMO

Monomer E	Monomer F	IE
Glu22−	Arg5+	−47.9
Asp23−	Arg5+	−37.9
Lys28+	Asp7−	−37.0
Asp23−	Asp7−	30.8
Lys28+	Arg5+	29.8
Glu22−	Asp7−	24.1

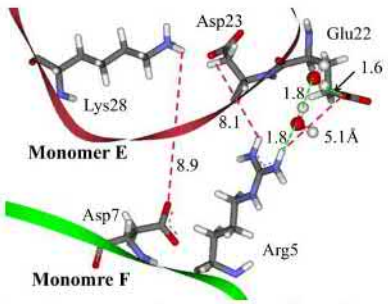


Figure 4. Interacting structures between some residues of monomers E and F in the lower Aβ hexamer; two water molecules bridge between Glu22 and Arg5 by hydrogen bonds.

In contrast, Table 5 indicates the strong repulsive interactions between Asp23(E) and Asp7(F), between Lys28(E) and Arg5(F), and between Glu22(E) and Asp7(F). Since these pairs are between the residues with the same signed charges, repulsive electrostatic interactions are likely to be main reason for the strong repulsive interactions. In a normal condition, these charged residues cannot come closer to each other. However, as indicated in Fig. 4, Glu22, Asp23 and Lys28 of the monomer E and Arg5 and Asp7 of the monomer F exist close to each other in the Aβ hexamer, due to the attractive interactions between the residues with the opposite signed charges. As shown in Table 5, the size of the attractive interactions is larger than that of the repulsive interactions. It is thus likely that the conformation of these charged residues is optimized so as to stabilize the attractive interactions.

In the Layer-1 of the Aβ hexamer with three-fold symmetry, the monomers D and E, and the monomers D and F interact with each other in the same way as the monomers E and F. In the D−E and the D−F pairs, the strong attractive interactions are caused as shown in Table 3. These interactions contribute significantly to the stabilization of the trimer with three-fold symmetry, and the specific interactions between the residues of these monomers were found to be similar as that for the E−F pair by the present FMO calculations.

Also, there are similar interactions between the monomers G, H and I of the Aβ trimer in the Layer-2, as indicated in Table 3. The specific interactions between the residues of these monomers are similar to those for the monomers D, E and F. Consequently, we conclude that the trimer structure with three-fold symmetry mainly comes from the electrostatic interactions between the charged residues of the Aβ monomers.

It is necessary to understand the mechanism of Aβ aggregation for developing potent medicines against AD. The previous studies [26–29] reported that the charged residues in Aβ contribute to the aggregation mechanism as well as the stability of β-sheets in the aggregates. However, the experimental study on the formation of Aβ fibrils and oligomers is confined to observation of their dynamical properties [30]. On the other hand, based on the results of solution NMR studies, Hou *et al.* [31] proposed a schematic picture for the initial stages of Aβ aggregation. However, they concluded that it is difficult to analyze the entire mechanism of the aggregation, due to the limitation of the experiments.

In the present *ab initio* molecular simulations for the solvated Aβ hexamer, we first elucidated that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pairs contribute more significantly to the stabilization of the hexamer than those between the monomers of the trimers formed in the same layer, as indicated in Table 3. In addition, the interactions between the charged residues of the turn-domain and the N-terminal domain of Aβ were found to be important for the formation of the trimer. Based on the results obtained by the present *ab initio* molecular simulations, the following hypothetic model for the Aβ aggregation mechanism can be proposed.

(1) Aβ monomers are stacked to build polymers such as dimer, trimer, and so on.

(2) In these polymers, positive and negative charges are polarized at the charged residues of the turn and the N-terminal domains.

(3) Three polymers get closer to each other to make a fibril with three-fold symmetry. In this step, electrostatic interactions between the charged residues at the turn-domain of a polymer and the N-terminal domain of its neighboring polymer contribute to getting these residues closer to each other and constructing the fibril.

From the view points of the interaction energies between the Aβ monomers shown in Table 3, the mechanism, in which the trimer with three-fold symmetry is created at first, is energetically unfavorable. If the above mentioned model is correct, we can propose an efficient agent for inhibiting the mechanism. Focused on the Step (3) of the above mechanism, an agent for blocking the formation of the fibrils with three-fold symmetry is proposed as a potent inhibitor against the Aβ aggregation. This agent binds specifically to the charged residues at the turn-domain or at the N-terminal domain of Aβ, in order to shield the charge of the residues and weaken their electrostatic interactions with the other charged residues.

IV. Conclusions

Using *ab initio* FMO calculations, we investigated the specific interactions between the Aβ monomers in the hexamer, whose structure is constructed based on the *in vivo* model of the Aβ aggregate obtained from the brains of AD patients. The FMO calculations for the solvated Aβ hexamer, which is composed of the stacked trimers with three-fold symmetry and solvating water molecules, reveal that the interactions between the monomers of the stacked Aβ pair contribute to the hexamer stability more significantly than those between the monomers of the trimer. In addition, it is elucidated that the charged amino acid residues such as Arg5, Asp7, Glu22, Asp23 and Lys28 mainly contribute to the strong attractive interactions between the paired monomers and that some water molecules form hydrogen-bond networks between the charged residues and enhance the stability of the solvated Aβ hexamer. Therefore, it is expected that agents binding specifically to these charged residues of Aβ can be potent inhibitors against the Aβ aggregation.

References

[1] F. M. Laird, *et al.*, "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions.", J. Neurosci., Vol. 25, pp. 11693–11709, 2005.

[2] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.", Physiol. Rev., Vol. 81, pp. 741–766, 2001.

[3] M. Rak, M. R.D. Bigio, S. Mai, D. Westaway, and K. Gough, "Dense-core and diffuse Aβ plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy.", Biopolymers, Vol. 87, pp. 207–217, 2007.

[4] S. A. Gravina, *et al.*, "Amyloid-β protein (Aβ) in Alzheimer's disease brain.", J. Biol. Chem., Vol. 270, pp. 7013–7016, 1995.

[5] A. E. Roher, *et al.*, "β-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease.", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 90, pp. 10836–10840, 1993.

[6] J. T. Jarrett, E. P. Berger, and P. T. Lansbury Jr., "The carboxy terminus of the β-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.", Biochemistry, Vol. 32, pp. 4693–4697, 1993.

[7] M. A. Findeis, "The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease.", Pharmacol. Ther., Vol. 116, pp. 266–286, 2007.

[8] S. W. Pimplikar, "Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease.", Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 41, pp. 1261–1268, 2008.

[9] P. T. Lansbury Jr., "Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease.", Curr. Opin. in Chem. Biol., Vol. 1, pp. 260–267, 1997.

[10] A. J. Doig, "Peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation.", Curr. Opin. in Drug Disc. & Devel., Vol. 10, pp. 533–539, 2007.

[11] J. X. Lu, *et al.*, "Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue.", Cell, Vol. 154, pp. 1257–1268, 2013.

[12] R. Tycko, "Physical and structural basis for polymorphism in amyloid fibrils.", Protein Sci., Vol. 23, pp. 1528–1539 , 2014.

[13] A. Kahler, H. Sticht, and A. H. C. Horn, "Conformational stability of fibrillary amyloid-beta oligomers via protofilament pair formation – A systematic computational study.", Plos One, Vol. 8, e70521, 2013.

[14] E. J. Alred, M. Phillips,W. M. Berhanu, and U. H. E. Hansmann, "On the lack of polymorphism in Aβ-peptide aggregates derived from patient brains.", Protein Sci., Vol. 24, pp. 923–935, 2015.

[15] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, and M. Uebayasi, "Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules.", Chem. Phys. Lett., Vol. 313, pp. 701–706, 1999.

[16] T. Nakano, *et al.*, "Fragment molecular orbital method: application to polypeptides." Chem. Phys. Lett., Vol. 318, pp. 614–618, 2000.

[17] D. G. Fedorov, T. Nagata, and K. Kitaura, "Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method.", Phys. Chem. Chem. Phys., Vol. 14, pp. 7562–7577, 2012.

[18] S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, and K. Fukuzawa, "Electron-correlated fragment-molecular-orbital calculations for biomolecular and nano systems.", Phys. Chem. Chem. Phys., Vol. 16, pp. 10310−10344, 2014.

[19] C. R. Søndergaard, M. H. M. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values." J. Chem. Theory Comput., Vol. 7, pp. 2284−2295, 2011.

[20] C. L. Stanton, and K. N. Houk, "Benchmarking pKa prediction methods for residues in proteins.", J. Chem. Theory Comput., Vol. 4, pp. 951−966, 2008.

[21] D. A. Case, *et al.*, AMBER12, University of California, San Francisco, 2012.

[22] J. Wang, P. Cieplak, and P. A. Kollman, "How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules?.", J. Comput. Chem., Vol. 21, pp. 1049−1074, 2000.

[23] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water." J. Chem. Phys., Vol. 79, pp. 926−935, 1983.

[24] Y. Mochizuki, et al., Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme." Theor. Chem. Acc., Vol. 130, pp. 515–530, 2011.

[25] A. Okamoto, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, and N. Kurita, "Stable conformation of full-length amyloid-β (1-42) monomer in water: replica exchange molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital simulations.", Chem. Phys. Lett., Vol. 577, pp. 131–137, 2013.

[26] A. T. Petkova, *et al.*, "A structural model for Alzheimer's β-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR.", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 99, pp. 16742–16747, 2002.

[27] T. Luhrs, *et al.*, "3D structure of Alzheimer's amyloid-β(1–42) fibrils.", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 102, pp. 17342–17347, 2005.

[28] A. T. Petkova, W. M. Yau, and R. Tycko, "Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β-amyloid fibrils.", Biochemistry, Vol. 45, pp. 498–512, 2006.

[29] D. Thirumalai, D. K. Klimov, and R. I. Dima, "Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation.", Curr. Opin. in Struc. Biol., Vol. 13, pp. 146–159, 2003.

[30] S. Lovas, Y. L. Zhang, J. P. Yu, and Y. L. Lyubchenko, "Molecular mechanism of misfolding and aggregation of Aβ(13–23).", J. Phys. Chem. B, Vol. 117, pp. 6175–6186, 2013.

[31] L. M. Hou, *et al.*, "Solution NMR studies of the Aβ(1−40) and Aβ(1−42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation.", J. Am. Chem. Soc., Vol. 126, pp. 1992–2005, 2004.

4.4 Вплив іона Zn на структуру та електронні стани β-амілоїдних наномерів

MOLECULAR SIMULATION
https://doi.org/10.1080/08927022.2019.1579328

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

Effect of Zn ion on the structure and electronic states of Aβ nonamer: molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital calculations

Shogo Tomioka[a], Haruki Sogawa[a], Tomoki Shinzato[a], Hiromi Ishimura[a], Akisumi Okamoto[a], Yaroslav Blume[b], Sergiy Shulga[b] and Noriyuki Kurita[a]

[a]Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Japan; [b]Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

ABSTRACT

Aggregates of amyloid-beta proteins (Aβ) have been recognised to be intimately related to pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Indeed, Aβ aggregates of various sizes from dimers to fibrils were found in the brains of AD patients, and these aggregates can be self-organised. Since abnormal accumulation of metal ions such as Zn, Cu and Fe was also observed in the brains, the association between Aβ aggregations and these metal ions has been studied widely. In the present study, to elucidate the influence of Zn ions on the stability of Aβ aggregates, we performed molecular dynamics (MD) simulations and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations on the Aβ nonamers with and without Zn ions and investigated the change in its structure and electronic states induced by Zn ions at atomic and electronic levels. The MD simulations revealed that Aβ nonamer cannot keep its symmetry structure, whereas Aβ nonamer with Zn ions keeps the structure. The FMO results indicated that electrostatic interactions among the charged amino-acid residues of Aβ nonamer are significantly changed by the influence of Zn ions to stabilise Aβ nonamer. These results provide useful information for proposing novel compounds, which binds specifically to Aβ and inhibits the Aβ aggregation.

ARTICLE HISTORY
Received 9 November 2018
Accepted 25 December 2018

KEYWORDS
Amyloid beta; Alzheimer's disease; molecular dynamics; fragment molecular orbital; protein-protein interaction;

1. Introduction

The number of patients with Alzheimer's disease (AD) is rapidly increasing recently, and the development of new treatments is an urgent research issue [1]. Aggregations of amyloid beta (Aβ) peptides in the brain have been recognised to be related with the onset of ADs [2]. Aβ peptide is generated by the degradation of amyloid precursor protein (APP) by β- and γ-secretase enzymes [3], and the generated Aβ peptides form oligomers of various sizes from dimers to fibrils in the brains of AD patients [4]. Therefore, it is expected that the risk of AD's onset can be reduced by inhibiting the Aβ aggregations.

To design new inhibiters against Aβ aggregation, it is necessary to clarify the stable structures of Aβ aggregates, the aggregation mechanism and the interactions between Aβ peptides in the aggregates. However, because of the non-crystalline and insolubility properties of Aβ aggregates [5], their structures cannot be determined by the usual methods such as X-ray crystal structure and solution nuclear magnetic resonance (NMR) analyses. Accordingly, solid-state NMR or electron paramagnetic resonance (EPR) analysis has been employed for determining the three-dimensional structures of Aβ aggregates [6,7]. These analyses elucidated that Aβ fibres are stabilised by the formation of β-sheets parallel to the fibre direction. Therefore, the conformation with these β-sheets is considered to be common to all amyloid fibrils, regardless of their biochemical properties [8].

Lu et al. [7] revealed a three-dimensional structure model with three-fold symmetry based on their solid-state NMR analysis for the Aβ fibrils excised from senile plaques in the brains of AD patients. It was also found that these Aβ fibrils adopt different structures characteristic for each AD patient. However, it is not clarified why the Aβ fibrils existing in the brains of AD patients have a characteristic three-fold symmetry.

It has been recognised that metal ions such as Zn and Al in a brain have significant influence on the Aβ aggregations, and the associations between metal ions and Aβ aggregations have been studied widely [9]. For example, the concentrations of metal ions Cu, Fe and Zn in the brains of AD patients were investigated to be 177, 466 and 339% respectively, compared with those in normal brains [10]. Among these metal ions, Zn ions are suggested to be deeply involved in forming the Aβ aggregations [11]. Furthermore, recent studies have shown that Zn binds specifically to the N-terminal of Aβ [12] and that Asp1, His6, Glu11, His13 and His14 residues of Aβ are involved in the Zn binding to Aβ [13–15]. On the other hand, the interactions between the parallel β-sheets of Aβ peptides were found to be important for the stability of Aβ aggregates, and most of the β-sheets were found in the C-terminal part of Aβ aggregates [12]. However, it is not elucidated how the Zn binding to the N-terminal site of Aβ influences the structure of the β-sheets at the C-terminal and the aggregation mechanism of Aβ monomers.

CONTACT Noriyuki Kurita kurita@cs.tut.ac.jp
© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

To elucidate the dynamic nature of the Zn-bound Aβ complexes and the mechanism of Aβ aggregation enhanced by Zn, molecular dynamics (MD) simulations [16,17] were carried out for the Aβ monomer and dimer with a Zn ion. In these MD simulations, only a Aβ(1−16) fragment, a part of the full-length Aβ(1−42), was considered for investigating the influence of Zn ion on the Aβ aggregation. The results [16] suggested that Zn-binding to Aβ accelerates the Aβ aggregation by unfolding the helical structure in Aβ peptide, while the recent study [17] indicated that quantum-mechanical techniques are needed for investigating the metal-containing system such as Aβ+Zn complexes.

In our recent study [18], we performed classical MD simulations and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations on the hexamer of Aβs, in which Aβ are composed of 40 residues (from the 1st to 40th residues of Aβ), in order to elucidate the specific interactions between Aβ monomers in the Aβ hexamer. In the present study, we moreover carried out the classical MD simulations on the Aβ nonamer with three-fold symmetry observed by the solid-state NMR analysis [7] and its complex with Zn ions to clarify the influence of Zn ions on the structure of Aβ nonamer. In addition, to reveal the change in electronic states induced by Zn addition, *ab initio* FMO calculations were conducted for several snapshots obtained from the MD simulations. Based on the FMO results, the specific interactions between Aβ monomers in the Aβ nonamer with and without Zn were analysed at the electronic level to elucidate the influence of Zn addition. The present results will be useful for proposing novel inhibitors against Aβ aggregations.

2. Details of molecular simulations

2.1. MD simulations for Aβ nonamers in water

In the present study, the solid NMR structure (PDB ID:2M4J [7]) was adopted as a model for the initial structure of Aβ nonamer, in which each Aβ monomer is composed of 40 residues (from the 1st to 40th residues of Aβ) including three His residues. Their protonated states were determined based on pKa values evaluated by the PROPKA 3.1 programme [19]. Since these His residues have pKa values larger than 6, their protonations were determined as Hip^+. As a result, the total charge of Aβ monomer became neutral. In the MD simulations, if the C- and N-terminals of Aβ peptide have charges, the aggregation mechanism of Aβ peptides have significantly affected by the electrostatic interactions between these charges, and the results of MD simulations are not realistic. We therefore added an acetyl and a N-methyl groups to the N- and C-terminals of each Aβ peptide, respectively, using the LEaP (Link, Edit and Parm) programme in the AMBER 12 programme package [20].

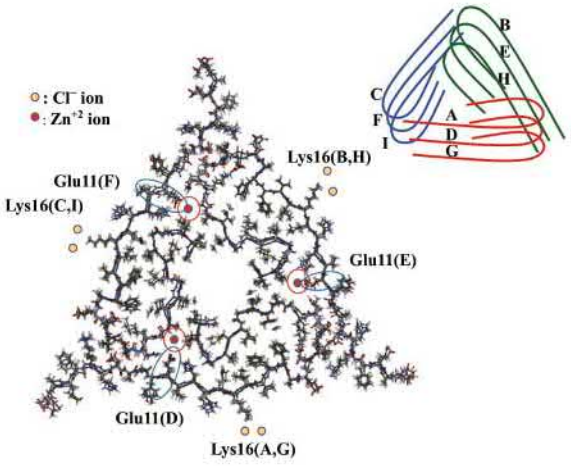


Figure 1. (Colour online) Initial positions of Zn and Cl^- ions in the Aβ nonamer+Zn complex for the MD simulations; Zn ions are placed near the negatively charged Glu11 residues, while Cl^- ions are placed near Lys16. A schematic picture of arranging nine Aβ monomers from A to I is also shown.

As for the positions of Zn ions in the Aβ aggregates, the previous studies [13–15] elucidated that Asp1, His6, Glu11, His13 and His14 of Aβ contribute to the binding between Aβ and Zn ion. Among these residues, since His exists as a positively charged Hip^+, Zn ions are unlikely to exist near His6, His13 and His14 residues, due to the repulsive interactions between Zn and these Hip^+ residues. Accordingly, we put Zn ions near the other residue (Asp1 or Glu11) and estimated the steric hindrance between Aβ and Zn ions. Since the steric hindrance of the structure with Zn ions arranged around Glu11 was found to be smaller than that arranged around Asp1, we selected Glu11 as the binding site of Zn ion. In fact, as shown in Figure 1, each Zn ion was added to the position near the COO^- group of the side chain of Glu11 in the monomers D, E and F, which are located in the middle layer of the Aβ nonamer. In addition, six Cl^- ions were added as counter ions to neutralise the + 6 charge of the complex of Aβ nonamer with three Zn ions. We placed the six Cl^- ions near the side chain of the positively charged Lys16 in the upper and the lower layers of Aβ nonamer, in order to not affect the structure of Aβ nonamer.

Figure 1 shows the initial structure of Aβ nonamer including three Zn and six Cl^- ions and a schematic picture of arranging of nine Aβ monomers (from A to I monomers) in the Aβ nonamer. Three-fold symmetric structure of Aβ nonamer is formed from three stacked trimers (ADG, BEH and CFI). The N-terminal region of a monomer and the turn region of its neighbouring monomer interact attractively in the same layer of Aβ nonamer, resulting in a three-fold symmetry structure of Aβ nonamer.

To carry out MD simulations in explicit water, we considered a cubic water box, whose size is 1.5 times as larger as the longest diameter of Aβ nonamer. Indeed, we set a $137.14 \times 137.14 \times 137.14$ Å^3 water box and carried out MD simulations in the box to consider precisely the effect of solvation. Totally, 84363 water molecules were considered explicitly in the MD and MM simulations. For the Aβ nonamer + Zn complex, a $117.79 \times 117.79 \times 117.79$ Å^3 water box including 51679 water molecules were used. Also, the MD simulations were executed by setting the periodic boundary condition in XYZ direction with the water box as a unit.

For the complexes of Aβ nonamer with and without Zn ions, the stable structures in water were determined by MM optimizations using the MM and MD simulation programme package GROMACS Ver.4.5.3 [21]. Subsequently, structural

equilibrium calculations were executed by 1 ns MD simulations under constant temperature and pressure condition (300 K, 1 atm), in order to relax the position and the density of the solvating water molecules. After optimising the size of the water box, 100 ns MD simulations were conducted under constant temperature and volume condition (300 K).

In the MM and MD simulations, AMBER99SB-ILDN force field [22] was used for Aβ amino acids, while water molecules were treated by the TIP3P model [23]. To prevent counter ions (Cl^-) from separating from the charged residues of Aβ and losing their role as counter ions during the MD simulations, Cl^- ions were constrained within 6 Å distance from the N atom of the side chain of the nearest amino acid Lys16.

2.2. Ab initio *FMO calculations for Aβ nonamer in water*

For the several snapshots obtained by the MD simulations for Aβ nonamer, their structures were optimised by MM calculation in water, and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations [24] were carried out for the MM optimised structures in water, to elucidate the interactions between Aβ monomers in the Aβ nonamer. In our previous study [18], the electronic states of the Aβ hexamer were investigated by the FMO calculations, considering explicitly the water molecules existing within 4 Å from the surface of Aβ hexamer, because the first solvation water molecules are included in these water molecules. In the present study for the Aβ nonamer, we employed the same condition for the solvating water molecules, because we considered that the specific interactions between the Aβ monomers in the Aβ nonamer are mainly affected by the first solvation water molecules, although the previous FMO study [25] revealed that the internal energy of a protein is affected by the water molecules in the second and the third solvent shells.

In fact, to compare the total energy of each solvated structure and determine the most stable structure, the number of water molecules considered in the FMO calculations was unified to 2004. Also, in order to analyse the interaction energies between the amino acid residues of Aβ nonamer and water molecules, each residue, each water molecule and Cl^- ion were assigned as a fragment in the FMO calculations.

It is noted that each Zn ion was assigned to the same fragment as Glu11 existing near Zn ion, because Zn ion coordinates with its surrounding residues. Furthermore, to evaluate interaction energies between Aβ residues more precisely, the *ab initio* MP2/6-31G method [26–28] of the FMO calculation programme ABINIT-MP Ver.6.0 [29,30] was employed to describe π−π stacking, NH−π and CH−π interactions with high accuracy. The specific interactions between the Aβ monomers in the Aβ nonamer with and without Zn were investigated by the interaction energy analysis of FMO [31,32].

3. Results and discussion

3.1. *Change in structure of Aβ nonamer with and without Zn obtained by MD simulations*

We first carried out 100 ns MD simulations for Aβ nonamers with and without Zn ions at 300 K. To clarify the structural changes in Aβ nonamer during the MD simulation, we analysed the root mean square derivation (RMSD) between the initial and the snapshot structures of Aβ nonamer. In this analysis, the two compared structures are fitted to overlap the main chain of Aβ nonamer, and RMSD was evaluated for the overall structure and for each stacked trimer of Aβ nonamer.

As shown in Figure 2, the RMSD of the overall structure sharply increases to 13 Å at around 20 ns, and it moreover increases to 16 Å at around 30 ns to reach to the maximum value. Subsequently, RMSD changes in the range of 12–16 Å. To clarify the reason for this noticeable change of RMSD, we also analysed the RMSD for each of the stacked trimers in Aβ nonamer. The results for the ADG, BEH and CFI trimers are shown in Figure 2, indicating that the change in RMSD of the overall structure is similar to that of the BEH trimer. Therefore, it is elucidated that the rapid increase in RMSD around 20–30 ns are mainly caused by the structural change of BEH trimer in Aβ nonamer. Actually, as shown in Figure 3(a), in the MD snapshot of Aβ nonamer at 27.74 ns, the N-terminal region of the BEH trimer is significantly separated from the turn region of the ADG trimer, and the three-fold symmetry of Aβ nonamer is completely broken. Accordingly, the present MD simulations reveal that significant structural change can occur in Aβ nonamer in water at 300 K.

Figure 2 also indicates that RMSD of the overall structure of Aβ nonamer increases after 60 ns and RMSD of the ADG trimer increases gradually after 40 ns. To elucidate the reason for these increases of RMSD, we investigated the number of hydrogen bonds between the stacked trimers. As shown in Figure 4, after the significant change of Aβ nonamer at around 20 ns, the hydrogen bonds between ADG and BEH trimers is disappeared, because of the separation of the N-terminal region of BEH trimer shown in Figure 3(a). In addition, after 60 ns, the number of hydrogen bonds between CFI and BEH clearly increases. Due to this enhancement of interactions between the trimers, the overall structure of Aβ nonamer is expected to change into more stable structure. In fact, in the Aβ nonamer structure at around 100 ns shown in Figure 3(b), the turn region of BEH trimer approaches the N-terminal region of CFI trimer to form hydrogen bonds. Consequently, the present MD simulations highlights the change in the structure of Aβ nonamer; (i) the N-terminal region of BEH trimer is separated

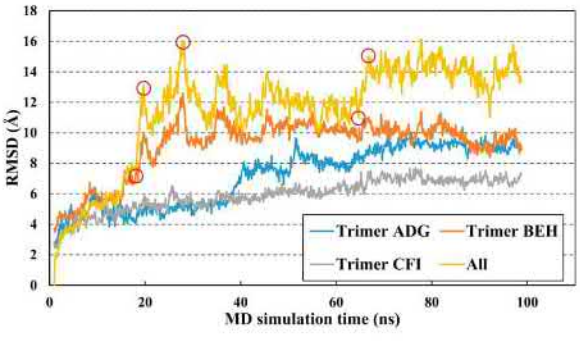


Figure 2. (Colour online) Change in RMSD of the overall structure Aβ nonamer without Zn and each stacked trimer (ADG, BEH and CFI) during the 100 ns MD simulations. Structures used for FMO calculations are depicted with red circles.

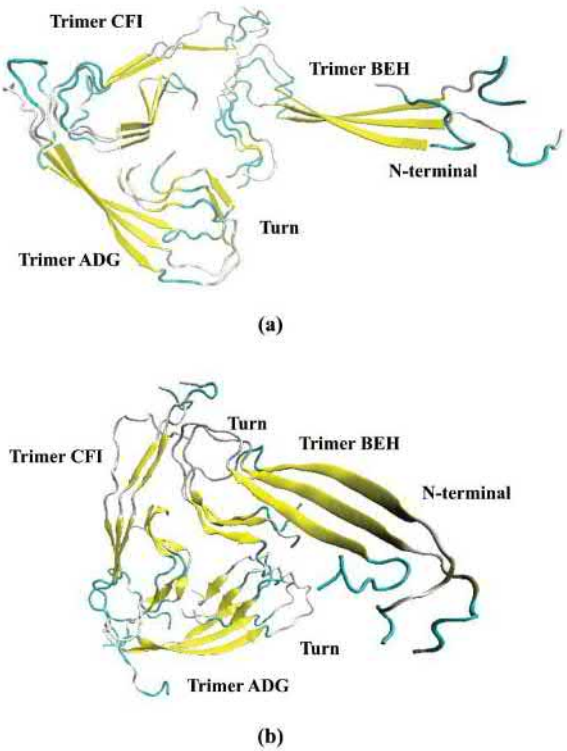


Figure 3. (Colour online) Structures of the snapshots for Aβ nonamer without Zn obtained by MD simulation in water; (a) at 27.740 ns and (b) at 100 ns.

at first and (ii) afterward the interactions between CFI and BEH trimers are enhanced to form the more stable structure of Aβ nonamer.

On the other hand, the addition of Zn ions to the Aβ nonamer with three-fold symmetry reduces the change in Aβ nonamer structure. As indicated in Figure 5, the RMSD is significantly smaller than that for Aβ nonamer and there is no drastic increase of RMSD until 90 ns. After 90 ns, the N-terminal region of BEH trimer is separated from the turn region of ADG trimer, resulting in a rapid increase of RMSDs for the

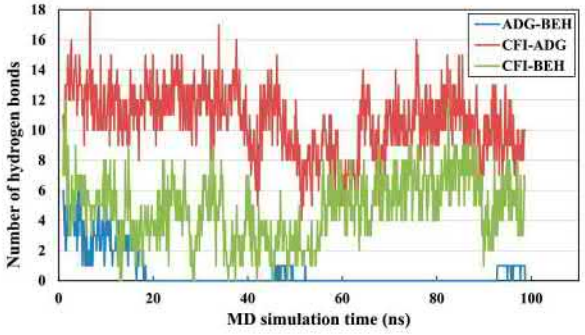


Figure 4. (Colour online) Change in the number of hydrogen bonds between stacked trimers (ADG, BEH and CFI) in Aβ nonamer without Zn during the 100 ns MD simulation.

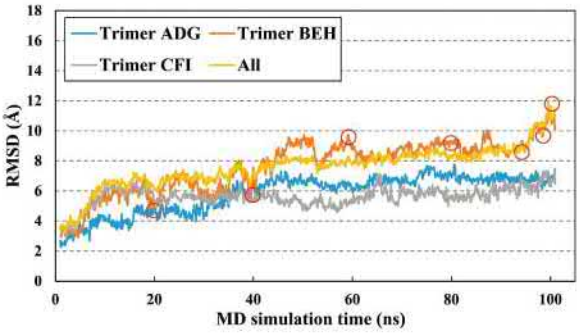


Figure 5. (Colour online) Change in RMSD of the overall structure Aβ nonamer with Zn ions and each stacked trimer (ADG, BEH and CFI) during the 100 ns MD simulations. Structures used for FMO calculations are depicted with red circles.

overall structure as well as the BEH trimer. Therefore, Figure 5 reveals that the change in conformation of BEH trimer is a main reason for the change in the structure of Aβ nonamer + Zn complex and that the change in the structure of Aβ nonamer is significantly reduced by the addition of Zn ions to Aβ nonamer. It is expected that Zn ions can stabilise the Aβ aggregates and contribute to producing the Aβ aggregates with larger sizes. These aggregates in the brain of AD patients are related with the onset of ADs.

The previous experiment [11] indicated that a person, who contains large amount of Zn ions in a brain, prefers to generate a larger number of Aβ aggregates in the brain and to develop AD. The present results elucidated by the MD simulations in water can explain qualitatively the trend of this experimental result.

However, to elucidate the influence of Zn ions on the specific interactions between Aβ monomers in the Aβ nonamer, it is necessary to consider the change of the electrostatic interactions between Zn ions and the charged amino acid residues in Aβ nonamer. In the classical MD simulations, the charges of atoms and ions are fixed at the initial values, and the redistribution of charges depending on the structural change cannot be considered. Therefore, in the present study, we performed *ab initio* FMO calculations and investigated how the interactions between Aβ monomers in Aβ nonamer are influenced by the presence of Zn ions at an electronic level.

3.2. Specific interactions between Aβ monomers in Aβ nonamer

To elucidate the change in the specific interactions between Aβ monomers in the Aβ nonamer induced by the change in the structure of Aβ nonamer during the MD simulations, we investigated the electronic properties of some snapshots obtained by the MD simulations by use of *ab initio* FMO calculations. In order to get the different structures of Aβ nonamer, we picked up the snapshots marked by the red circles in Figure 2 for the FMO calculations. These snapshots were obtained before and after the structural changing, as indicated by the change in RMSD. In fact, the five snapshots at 18.145, 19.651, 27.334, 65.304 and 77.708 ns were employed for the FMO calculations.

Table 1. Total energies (TE: kcal/mol) and interaction energies (IE: kcal/mol) for the five snapshot structures of Aβ nonamer without Zn obtained by MD and MM simulations.

			Aβ residues		Aβ and waters		Waters	
Time (ns)	TE	ΔTE	IE	ΔIE	IE	ΔIE	IE	ΔIE
18.145	−182375811.2	596.3	−14807.3	1111.4	−20984.0	−1158.8	−39686.1	1728.3
19.651	−182375904.0	503.5	−14713.3	1205.5	−20822.8	−997.6	−40257.9	1156.5
27.334	−182375385.0	1022.5	−15086.7	832.0	−20366.4	−541.2	−39413.4	2001.0
65.304	−182376120.2	287.3	−15684.3	234.4	−19885.0	−59.8	−40878.0	536.4
77.708	−182376407.5	0.0	−15918.7	0.0	−19825.2	0.0	−41414.4	0.0

Table 1 lists the total energy (TE) of each structure, the interaction energy (IE) between Aβ residues, the IE between Aβ residues and water molecules, and the IE between water molecules. The structure at 77.708 ns was found to be the most stable from the comparison of TEs and at least 287 kcal/mol more stable than the other structures. From the comparison of IEs listed in Table 1, it is elucidated that this stability of Aβ nonamer comes mainly from the difference in IEs between Aβ residues and between water molecules. In particular, the IE between Aβ residues gradually becomes lower during the MD simulation, indicating that Aβ nonamer itself is more stabilised. In contrast, the IE between Aβ residues and water molecules increases gradually during the MD simulations, indicating that the Aβ nonamer changes into a structure that weakens the interaction with surrounding water molecules.

To clarify which interactions among Aβ monomers are important for the stability of Aβ nonamer, we analysed IEs between the trimers formed from three monomers stacked in the fibre formation direction (stacked trimer) and between the trimers consisting of three monomers formed in the same layer (planate trimer). The assignment of each monomer in the Aβ nonamer is shown in Figure 1. As listed in Table 2, the attractive IE between the trimers ADG and BEH is significantly smaller than those between the other trimers. This result comes from the fact that the N-terminal domain of BEH is completely separated from the turn domain of ADG as shown in Figure 3(a). On the other hand, the attractive IEs between the planate trimers increase significantly, producing stronger couplings between the planate trimers. Table 2 also reveals the important feature that the attractive interactions between the planate trimers are remarkably stronger than those between the stacked trimers in the Aβ nonamer. In the other words, the interactions between the Aβ monomers existing in the different layers contribute more significantly to the stabilisation of Aβ nonamer than those between the Aβ monomers existing in the same layer.

Table 2. Interaction energies (kcal/mol) between the stacked trimers (ADG, BEH and CFI) and the planate trimers (ABC, DEF and GHI) in the Aβ nonamer for the five snapshot structures without Zn obtained by MD and MM simulations.

	Between stacked trimers			Between planate trimers		
Time (ns)	ADG-BEH	BEH-CFI	CFI-ADG	ABC-DEF	DEF-GHI	GHI-ABC
18.145	−22.4	−166.0	−273.3	−1271.7	−1482.8	−64.0
19.651	−13.1	−132.2	−246.0	−1278.4	−1374.5	−46.6
27.334	−14.2	−184.4	−190.6	−1347.2	−1469.0	−258.7
65.304	−22.1	−282.0	−247.0	−1384.7	−1195.2	−225.4
77.708	−28.4	−427.1	−287.5	−1385.8	−1209.7	−182.8

In order to highlight which interactions between Aβ monomers are important for the stabilisation of Aβ nonamer, we moreover investigated the IEs between the monomers for the most stable structure of Aβ nonamer at 77.708 ns. As listed in Table 3, strong attractive interactions of −284.9 kcal/mol or larger IE are confirmed between the stacked monomers (A-D, B-E, C-F, D-G, E-H and F-I). These paired monomers exist at the adjacent layers and form a stacked dimer. Table 3 indicates that these interactions are the main factor for the stabilisation of Aβ nonamer. On the other hand, the interactions between the monomers forming a trimer within the same layer are weak. The interaction energy is at most −112.7 kcal/mol between the monomers A and C, which form a trimer in the upper layer. We also confirmed that the tendency of IEs listed in Table 3 exists for the other snapshot structures obtained by the MD simulation. Accordingly, it can be concluded that the interactions between the stacked Aβ monomers contribute more significantly to the stabilisation of Aβ nonamer.

Furthermore, to identify which amino acid residues of Aβ monomer are important for the stabilisation of Aβ nonamer, we investigated the interactions between Aβ residues of the monomers A and D, since the IE between these monomers is the largest (−483.4 kcal/mol) among all pairs of monomers, as shown in Table 3. Some residues of the monomers A and D interact strongly to each other and have large IEs. Table 4

Table 3. Interaction energies (kcal/mol) between the Aβ monomers in the Aβ nonamer without Zn for the most stable structure determined by *ab initio* FMO calculations. Definitions of Aβ monomers are shown in Figure 1.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Upper	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	−8.5	–	–	–	–	–	–	–	–
	C	−112.7	−77.8	–	–	–	–	–	–	–
Middle	D	−483.4	−3.4	−27.1	–	–	–	–	–	–
	E	−4.0	−386.4	−23.3	−0.1	–	–	–	–	–
	F	−32.8	−37.4	−388.1	−98.8	−64.1	–	–	–	–
Lower	G	−6.7	−3.1	−1.8	−284.9	−0.0	−9.2	–	–	–
	H	−4.5	−152.3	−1.1	−1.0	−423.5	−41.4	−3.8	–	–
	I	-0.6	−32.6	-5.4	-13.5	−105.3	−358.0	−19.3	−44.3	–

Table 4. Interaction energies (IE: kcal/mol) between some amino acid residues of Aβ monomer in the most stable structure of Aβ nonamer without Zn determined by *ab initio* FMO calculations; (a) between monomers A and D and (b) between monomers A and C.

Monomers pair	Amino acid residues		IE
(a) A and D	Asp7	Arg5	−99.9
	Hip13	Glu11	−97.3
	Hip6	Glu3	−46.9
(b) A and C	Arg5	Asp23	−123.9
	Asp7	Lys28	−42.4
	Asp1	Lys28	−39.0

(a) lists the paired residues and IE between them, whose size of IE is larger than 30 kcal/mol. The IEs between Asp7(A) and Arg5(D) and between Hip13(A) and Glu11(D) are significantly larger than the other pairs. In addition, Hip6(A) and Glu3(D) interact strongly. These residues have negative or positive charge, and the charged groups of their side chains interact electrostatically to each other as indicated in Figures 6(a,b).

We also investigated the IEs between the residues of the monomers A and C. They form a trimer with a three-fold symmetry in the same layer. As listed in Table 4(b), the IE between Arg5(A) and Asp23(C) is the largest (−123.9 kcal/mol) among the all pairs of residues. As shown in Figure 6(c), the NH_2^+ group of the Arg5 side chain and the COO^- group of the Asp23 form two hydrogen bonds between them. In addition, negatively charged Asp7 and Asp1 of the monomer A and a positively charged Lys28 of the monomer C interact strongly. These residues are a little separated, as shown in Figure 6(c), however, long-range electrostatic interactions between these charged residues produce large (about −40 kcal/mol) IEs, as listed in Table 4(b). Therefore, it is elucidated that hydrogen bonding and electrostatic interactions between the charged residues of Aβ monomers are important for stabilising the Aβ nonamer.

3.3. Effect of Zn ions on the specific interactions between monomers in Aβ nonamer

For the purpose of clarifying the change in the interaction between the Aβ monomers in Aβ nonamers induced by the addition of Zn ions, we carried out FMO calculations for several specific structures obtained by the MD simulation. As marked by the red circles in Figure 5, we selected seven structures before and after the significant structural change at around 95 ns. In fact, the snapshots at 21.021, 39.308, 62.631, 82.168, 95.512, 99.521 and 98.294 ns were employed for the *ab initio* FMO calculations, in which each of three Zn ions was included in the same fragment of Glu11 of the monomer C, D or H, respectively. The TEs and IEs evaluated for each structure of Aβ nonamer + Zn complex are listed in Table 5. From the comparison of TEs, the structure at 62.631 ns was found to be the most stable. Since the structure of the complex keeps its three-fold symmetry until 95.512 ns in the MD simulation, Table 5 indicates that most of the structures with three-fold symmetry before 95.512 ns are more stable than that at 99.521 ns for the Aβ nonamer + Zn complex. In fact, as shown in Figure 7, the Aβ nonamer + Zn complex keeps its symmetric structure even at 27.734 ns, while Figure 3(a)

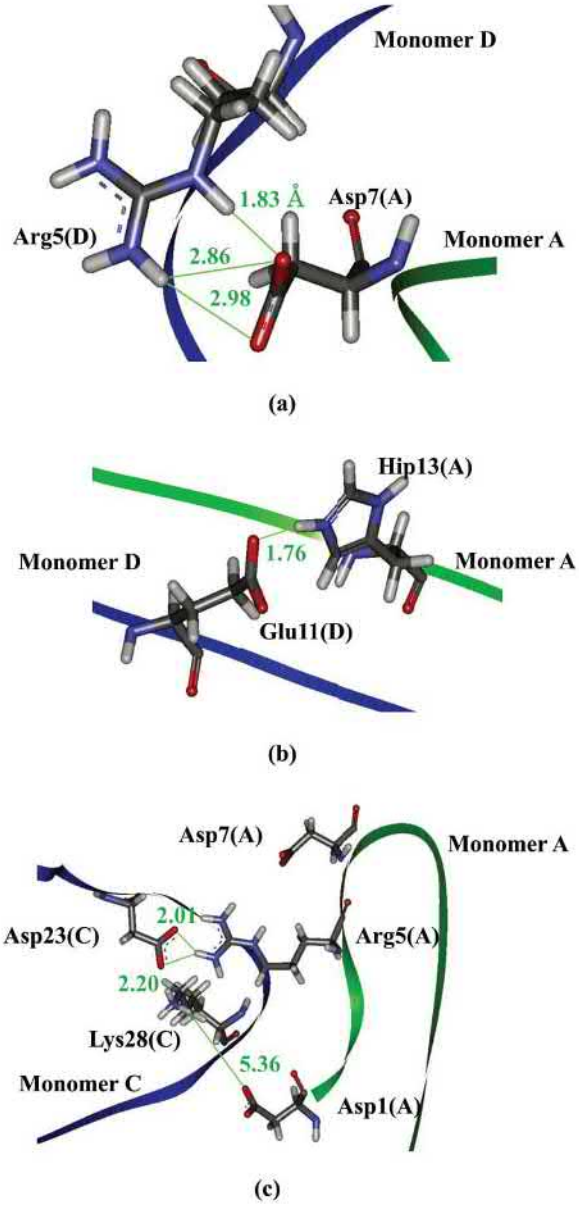


Figure 6. (Colour online) Interacting structures between amino acid residues of different monomers; (a) Asp7(A) and Arg5(D), (b) Hip13(A) and Glu11(D), and (c) some residues of monomers A and C.

indicates the symmetry-broken structure of Aβ nonamer at the same MD simulation time.

To reveal the influence of Zn ions on the stability between the trimers, IEs between the stacked trimers and between the planate trimers were investigated for the seven structures. Compared with the result (Table 2) for the Aβ nonamer without Zn, Table 6 indicates that the IEs between the planate trimers are more greatly increased by the addition of Zn ions, compared with those between the stacked trimers. It is also noted that there is no tendency for the IE to uniformly increase during the MD simulation, as in the case for the Aβ nonamer.

Table 5. Total energies (TE: kcal/mol) and interaction energies (IE: kcal/mol) for the seven snapshot structures of Aβ nonamer+Zn complex obtained by MD and MM simulations.

			Aβ residues		Aβ and water		Waters	
Time (ns)	TE	ΔTE	IE	ΔIE	IE	ΔIE	IE	ΔIE
21.021	−187453669.4	361.5	−15160.8	646.7	−20643.7	−22.4	−41148.2	−53.9
39.308	−187453368.9	662.0	−14758.3	1049.3	−20941.9	−320.6	−40046.2	−1048.1
62.631	−187454030.9	0.0	−15807.5	-0.0	−20621.3	-0.0	−41094.4	- 0.0
82.168	−187453731.4	299.5	−16751.1	−943.6	−20115.4	505.9	−40773.6	-320.8
95.512	−187453899.4	131.5	−14683.6	1124.0	−17329.3	3292.0	−42126.6	−1032.2
98.294	−187453956.5	74.4	−16604.8	−797.3	−20135.1	486.2	−41397.0	−302.7
99.521	−187453558.6	472.3	−16433.0	−625.5	−20023.7	597.6	−40673.0	-421.4

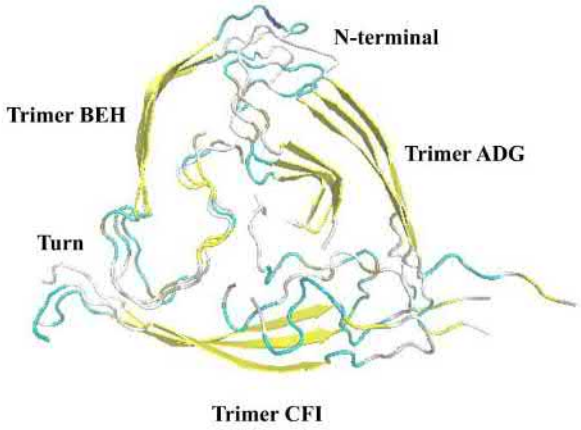


Figure 7. (Colour online) Structure of Aβ nonamer+Zn complex obtained by MD simulation at 27.734 ns.

Therefore, Table 6 demonstrates that the interactions between the planate trimers contribute more significantly to the stability of the Aβ nonamer + Zn complex.

Table 6. Interaction energies (kcal/mol) between the stacked trimers (ADG, BEH and CFI) and between the planate trimers (ABC, DEF and GHI) in the Aβ nonamer+Zn complex for the seven snapshot structures obtained by MD and MM simulations.

	Between stacked trimers			Between planate trimers		
Time (ns)	ADG-BEH	BEH-CFI	CFI-ADG	ABC-DEF	DEF-GHI	GHI-ABC
21.021	−349.4	−273.1	−629.8	−1646.1	−1569.3	61.8
39.308	−405.9	−405.9	−491.2	−1608.4	−1450.1	171.1
62.631	−104.3	−343.2	−571.3	−1829.0	−1613.9	30.7
82.168	−219.6	−455.0	−570.3	−1880.0	−1612.5	−81.7
95.512	16.2	−527.8	−444.4	−1785.9	−1628.1	−21.7
98.294	17.5	−397.4	−589.7	−1795.9	−1730.5	-2.7
99.521	8.2	−334.9	−569.8	−1819.8	−1684.1	−5.5

In addition, we investigated the IEs between each Aβ monomer for the most stable structure at 62.631 ns of the Aβ nonamer + Zn complex. As listed in Table 7, the IEs between the stacked monomers (A-D, B-E, C-F, D-G, E-H and F-I) are at most −772.0 kcal/mol for the C-F pair. The IE between the monomers E and H is equally large. On the other hand, the IEs between the monomers existing in the same layer are at most −348.1 kcal/mol for the D-F pair, whose size is significantly smaller than those of the stacked pairs. To clarify the influence of Zn addition, we compared the results listed in Tables 3 and 7. The IEs between the stacked monomers are enhanced by about two times by the Zn addition. Therefore, it can be concluded that the interactions between the layers are enhanced more significantly by the Zn addition, resulting in more stable structure of the Aβ nonamer + Zn complex.

To highlight the important amino acid residues for the stabilisation of the Aβ nonamer + Zn complex, we investigated the IEs between Aβ residues for the most stable structure of the complex. To distinguish three Zn ions, Zn in the same fragment of Glu11 of the monomer C, D or H was defined as Zn(C), Zn (D) and Zn(H), respectively. Table 8 lists some pairs of the residues and the IEs between them, whose size of IEs are larger than −30 kcal/mol. As for the IEs between the stacked monomers C and F, the IE between Glu11 + Zn(C) and Glu11(F) is very large (−383.9 kcal/mol), and this interaction is considered to be a main factor for the strong interaction between the stacked monomers C and F. As shown in Figure 8(a), Zn(C) ion is coordinated with the two oxygen atoms of the Glu11 (F) side chain as well as the oxygen atom of the Glu11(C) side chain. In addition, three water molecules exist near Zn (C) in the solvated structure of the Aβ nonamer + Zn complex. It is therefore elucidated that Zn(C) has remarkable effect of pulling the Glu11(F) side chain closer to the Glu11(C) side chain, resulting in the strong attractive interaction between the monomers C and F. In addition, Table 8(a) indicates that

Table 7. Interaction energies (kcal/mol) between the Aβ monomers in the Aβ nonamer+Zn complex for the most stable structure determined by *ab initio* FMO calculations.

		A	B	C	D	E	F	G	H
Upper	A	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	−7.4	–	–	–	–	–	–	–
	C	−99.4	−76.3	–	–	–	–	–	–
Middle	D	−524.0	−12.6	-40.0	–	–	–	–	–
	E	−10.3	−484.9	−13.3	−50.4	–	–	–	–
	F	−45.9	−6.2	−772.0	−348.1	−107.2	–	–	–
Lower	G	-66.9	−0.9	−13.3	−537.2	−13.3	−25.7	–	–
	H	−5.6	−42.4	-18.0	-42.5	−760.7	−31.7	−48.2	–
	I	−8.3	−6.0	-20.4	−9.0	−52.6	−226.1	−61.8	−67.9

Note: Definitions of Aβ monomers are shown in Figure 1.

the positively charged residues (Hip6 and Arg5) of the monomer C and the negatively charged residues (Glu3, Asp1 and Asp7) of the monomer F interact strongly by the electrostatic interactions.

As listed in Table 8(b), the IEs between the planate monomers D and F are significantly smaller than those between the stacked monomers. The Glu11 + Zn of the monomer D interacts strongly with Gly29 and Asn27 of the monomer F. As shown in Figure 8(b), Zn(D) is strongly coordinated with the oxygen atoms of the Glu11(D) side chain, the oxygen atom of the Asn27(F) side chain and the backbone between Lys28(F) and Gly29(F). Due to these coordination bonds around Zn(D) ion, Glu11(D), Asn27(F) and Lys28(F) get together. In addition, the charged residues Arg5(D) and Glu22(F) interact strongly to each other.

As for the IEs between the other stacked monomers (E and H), Table 8(c) indicates that Glu11(E) and Glu11(H)+Zn(H) interact strongly with very larger (−364.7 kcal/mol) attractive IE. As shown in Figure 8(c), Zn(H) is coordinated strongly with three oxygen atoms of the side chains of Glu11(H) and Glu11(E). In addition, three water molecules are hydrated around Zn(H). Table 8(c) also indicates that Asp23(E) and Lys28(H) interacts strongly to contribute to the strong attractive interaction between the monomers E and H. Consequently, it is elucidated from Table 8 and Figure 8 that Zn(C) and Zn(H) ions significantly enhance the interactions between the stacked monomers (C and F, and E and H), while Zn(D) ion enhances the interactions between the monomers D and F existing in the same layer of Aβ nonamer.

Moreover, we investigated the IEs between Zn ion and Aβ residues in the Aβ nonamer to elucidate which residues interact strongly with the three Zn ions. As shown in Table 9, Zn(C) and Zn(H) strongly interact with the negatively charged Glu11 and Asp7 of the different monomers. In particular, the IEs between Zn(C) and Glu11(F) and between Zn(H) and Glu11(E) are significantly larger than those of the other pairs, indicating that these Zn ions are trapped to these residues. It was also revealed that the positive charge of these Zn ions attracts the negatively charged COO^- groups of the side chains of Glu11, which belong to different monomers. As a result, coordination bonds are formed between Zn ion and the oxygen atoms of the COO^- groups as shown in Figures 8(a,c), leading to the stabilisation of Aβ nonamer induced by the Zn addition.

Table 8. Interaction energies (IE: kcal/mol) between some amino acid residues of Aβ monomers in the most stable structure of Aβ nonamer+Zn complex determined by *ab initio* FMO calculations; (a) between monomers C and F, (b) between monomers D and F, and (c) between monomers E and H.

Pair of monomers	Amino acid residues		IE
(a) C and F	Glu11+Zn(C)	Glu11	−383.9
	Hip6	Glu3	−129.5
	Arg5	Asp1	−97.8
	Hip6	Asp7	−66.2
	Arg5	Glu3	−59.7
(b) D and F	Glu11+Zn(D)	Gly29	−123.9
	Arg5	Glu22	−42.4
	Glu11+Zn(D)	Asn27	−39.0
(c) E and H	Glu11	Glu11+Zn(H)	−364.7
	Asp23	Lys28	−127.7
	Asp7	Glu11+Zn(H)	−40.9

In contrast, the IEs between Zn(D) and the Aβ residues, at largest −138 kcal/mol, are smaller compared with those for Zn(C) and Zn (H), as listed in Table 9. Therefore, it is elucidated that the influence of Zn(D) added to the monomer D is smaller than those of Zn(C) and Zn(H) added to the monomers C and H.

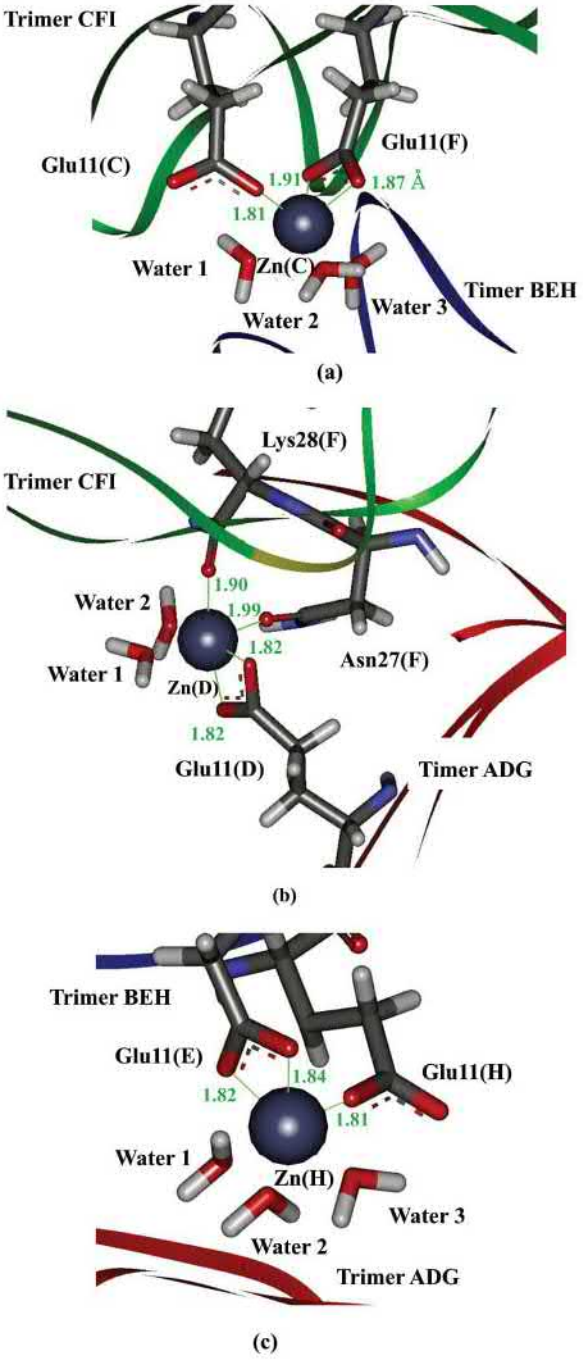


Figure 8. (Colour online) Interacting structures between Zn and amino acid residues of Aβ nonamer; (a) Zn(C), (b) Zn(D) and (c) Zn(H) and some Aβ residues and water molecules.

Table 9. Interaction energies (IE: kcal/mol) between Zn ion and some amino acid residues of Aβ in the most stable structure of the Aβ nonamer+Zn complex; (a) Zn (C) and BEH or CFI trimer, (b) Zn(H) and ADG or BEH trimer, and (c) Zn(D) and CFI or ADG trimer.

Zn	Amino acid residues	IE
(a) Zn(C)	Glu11(F)	−383.9
	Glu11(I)	−71.7
(b) Zn(H)	Glu11(E)	−364.7
	Glu11(B)	−65.8
	Asp7(B)	−59.4
(c) Zn(D)	Gly29(F)	−138.0
	Glu11(G)	−106.1
	Asp1(G)	−85.7
	Asn27(F)	−65.8

Note: Zn(C), Zn(D) and Zn(H) ions are located near the Glu11 residue of the monomer C, D and H, respectively.

4. Conclusions

In the present study, we investigated the change in structure and specific interactions between Aβ monomers in the Aβ nonamer with and without Zn ions, to elucidate the influence of Zn addition on these properties, using MD and *ab initio* FMO calculations. The results clarified the following points.

(1) The structure of Aβ nonamer with three-fold symmetry, which was modelled based on the solid-state NMR analysis [7] for the Aβ fibrils excised from the senile plaques, is difficult to exist as a stable structure in water during the MD simulation at 300 K.
(2) In the Aβ nonamer, the interactions between the Aβ monomers stacked in the fibre axis direction are notably stronger than those between the Aβ monomers forming a trimer in the same layer.
(3) By adding three Zn ions into the Aβ nonamer, the nonamer structure is significantly stabilised to keep its three-fold symmetry during the MD simulation at 300 K.
(4) In the Aβ nonamer + Zn complex, two Zn ions coordinate strongly to the negatively charged COO^- groups of Glu11 residues existing at the N-terminal part of Aβ monomers, contributing to the stabilisation of the Aβ nonamer + Zn complex.

It has been recognised that metal ions such as Zn and Al in a brain have significant influence on the Aβ aggregations [9]. However, the aggregation mechanism enhanced by the metal ions is not elucidated. The present molecular simulations revealed that Zn ions bind to some specific residues of Aβ in the Aβ nonamer and stabilise the nonamer structure significantly. It is therefore expected that compounds with binding affinity to the specific residues of Aβ can inhibit the binding of Zn ions to Aβ and suppress the formation of Aβ fibrils. These compounds will be efficient as novel therapeutic agents for ADs.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was supported by the international internship programme of Japan Student Services Organization (JASSO), the student exchange programme between the institute for food biotechnology and genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology, and the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of the National Academy of Sciences of Ukraine.

References

[1] Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & Dementia. 2018;14:367–429.
[2] Findeis MA. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. Pharmacol Ther. 2007;116:266–286.
[3] Tycko R. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. Q Rev Biophys. 2006;39:1–55.
[4] Luca S, Yau WM, Leapman R, et al. Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR. Biochemistry. 2007;46:13505–13522.
[5] Thompson LK. Unraveling the secrets of Alzheimer's β-amyloid fibrils. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2003;100:383–385.
[6] Qiang W, Yau WM, Luo YQ, et al. Antiparallel β-sheet architecture in Iowa-mutant β-amyloid fibrils. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2012;109:4443–4448.
[7] Lu JX, Qiang W, Yau WM, et al. Molecular structure of β-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. Cell. 2013;154:1257–1268.
[8] Westermark P. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. FEBS J. 2005;272:5942–5949.
[9] Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, et al. Copper, iron and Zn in Alzheimer's disease senile plaques. J Neurol Sci. 1998;158:47–52.
[10] Deshpande A, Kawai H, Metherate R, et al. A role for synaptic Zn in activity-dependent Aβ oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. J Neurosci. 2009;29:4004–4015.
[11] Miller L, Wang Q, Telivala T, et al. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β-amyloid deposits in Alzheimer's disease. J Struct Biol. 2006;155:30–37.
[12] Shewmaker F, McGlinchey RP, Wickner RB. Structural insights into functional and pathological amyloid. J Biol Chem. 2011;286:16533–16540.
[13] Bruno A, Amandine CD, Stephanie S, et al. Zn(II) binding site to the amyloid-β peptide: insights from spectroscopic studies with a wide series of modified peptides. Inorg Chem. 2016;55:10499–10509.
[14] Severine Z, Sergey AK, Alexey KM, et al. Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon Zn binding and in vitro aging. J Biol Chem. 2006;281:2151–2161.
[15] Talmard C, Leuma YR, Faller P. Mechanism of Zn(II)-promoted amyloid formation: Zn(II) binding facilitates the transition from the partially alpha-helical conformer to aggregates of amyloid beta protein. J Biol Inorg Chem. 2009;14:449–455.
[16] Pan L, Patterson JC. Molecular dynamics study of Zn(Aβ) and Zn (Aβ)2. PLoS One. 2013;8:e70681.
[17] Nishizawa H, Okumura H. Classical molecular dynamic simulation to understand role of a zinc ion for aggregation of amyloid-β peptides. J Comput Chem Jpn. 2018;17:76–79.
[18] Ishimura H, Tomioka S, Kadoya R, et al. Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: *ab initio* fragment molecular orbital calculations in water. Chem Phys Lett. 2017;672:13–20.
[19] Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, et al. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. J Chem Theory Comp. 2011;7:525–537.
[20] Case DA, et al. AMBER 12, University of California, San Francisco. 2012.
[21] Van DSD, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free. J Comput Chem. 2005;26:1701–1718.
[22] Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, et al. Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99SB protein force field. Proteins. 2010;78:1950–1958.

[23] Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J Chem Phys. 1983;79:926–935.
[24] Kitaura K, Ikeo E, Asada T, et al. Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules. Chem Phys Lett. 1999;313:701–706.
[25] Komeiji Y, Ishida T, Fedorov DG, et al. Change in a protein's electronic structure induced by an explicit solvent: an *ab initio* fragment molecular orbital study of ubiquitin. J Comp Chem. 2007;28:1750–1762.
[26] Mochizuki Y, Nakano T, Koikegami S, et al. A parallelized integral-direct second-order møller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme. Theor Chem Acc. 2004;112:442–452.
[27] Mochizuki Y, Koikegami S, Nakano T, et al. Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme. Chem Phys Lett. 2004;396:473–479.
[28] Fedorov DG, Kitaura K. Second order Moeller-Plesset perturbation theory based upon the fragment molecular orbital method. J Chem Phys. 2004;121:2483–2490.
[29] Mochizuki Y, Yamashita K, Nakano T, et al. Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme. Theor Chem Acc. 2011;130:515–530.
[30] Tanaka S, Mochizuki Y, Komeiji Y, et al. Electron-correlated fragment-molecular-orbital calculations for biomolecular and nano systems. Phys Chem Chem Phys. 2014;16:10310–10344.
[31] Nakano T, Kaminuma T, Sato T, et al. Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential. Chem Phys Lett. 2002;351:475–480.
[32] Fukuzawa K, Nakano T, Kato A, et al. Applications of the fragment molecular orbital method for bio-macromolecules. J Comp Chem. 2007;6:185–198.

4.5 Специфічні взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ

Chemical Physics 530 (2020) 110603

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphys

Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: Molecular docking and *ab initio* molecular orbital calculations

Haruki Sogawa[a], Riku Sato[a], Katsumi Suzuki[a], Shogo Tomioka[a], Tomoki Shinzato[a], Pavel Karpov[b], Sergey Shulga[b], Yaroslav Blume[b], Noriyuki Kurita[a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan
[b] Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osypovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine

ARTICLE INFO

Keywords:
FtsZ protein
Mycobacterium tuberculosis
Zantrin
Inhibitors
Fragment molecular orbital
Protein ligand docking
Ligand binding site

ABSTRACT

Filamentous temperature-sensitive Z (FtsZ) protein contributes to bacteria cell division, and its inhibition prevents *Mycobacteria* reproduction. In the present study, Zantrin Z3 and ZZ3 were adopted as inhibitors against FtsZ and their binding properties to FtsZ were investigated, using *ab initio* molecular simulations based on protein–ligand docking, classical molecular mechanics and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. From the total energies of several structures evaluated by the *ab initio* FMO calculations, we specified the most preferable binding-sites of Z3/ZZ3 to FtsZ and highlighted the key amino acid residues contributing to the binding of these inhibitors at an electronic level. In addition, we revealed the reason why ZZ3 is more potent against FtsZ than Z3 and that ZZ3 is effective for inhibiting the FtsZ aggregation.

1. Introduction

Tuberculosis (TB), one of the most widespread infectious diseases, is caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) [1,2]. According to the World Health Organization (WHO) statistics of 2016 [1], approximately 10 million new patients with TB occur each year, and TB is one of the top ten causes of death worldwide. To overcome this serious situation, WHO aims to establish technology for developing novel drugs, which are effective for preventing a severe epidemic of TB.

In the treatment of TB, various kinds of drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol have been administered. However, there is a considerable potential for Mtb to have resistance against these drugs [3,4]. In particular, Mtb having resistance against multiple drugs is called multidrug-resistant TB (MDR-TB), and the number of MDR-TBs is increasing rapidly. Only in the case of the most effective TB-drug – rifampicin, WHO reported 490,000 cases of MDR-TB. In addition, about 9.5% of MDR-TBs were found to be an extra-drug-resistant: XDR-TB [2]. Therefore, in the development of new drugs against TB, it is necessary to develop effective anti-TB drugs targeting more conservative proteins [5]. Moreover the treatment of TB should be completed in a short time, because prolongation of the treatment may generate new MDR-TBs. Accordingly, it is required to develop strong anti-TB drugs that can shorten the treatment period [6].

Recently, new drugs have been developed, which suppress the proliferation of Mtb-TB by inhibiting the division of Mtb cell [7]. In order for bacteria to undergo the cell division, a cytoskeletal protein (filamentous temperature-sensitive Z: FtsZ) is indispensable, because FtsZ plays an important role in forming cell division walls during the cell division process. FtsZ exists in bacterial cells and controls cell division by use of a series of proteins called the Min family [8]. At the beginning of prokaryotic cell division, FtsZs form a cytokinetic ring (Z-ring) in the center of the cell, which acts as a scaffold for association of other proteins to the cell division [8]. Subsequently, new cell wall is developed between the dividing cells. Finally, by closing the Z-ring, the cell is divided into two cells. Therefore, the inhibitor against the Z-ring formation is expected to be efficient for suppressing the growth of Mtb cell. In addition, the inhibitor is likely to have a small side effect, because the amino acid residues in the homologous sites of the Mtb FtsZ are significantly different for those of the tubulin isoforms in human [9].

As shown in Fig. 1(a), FtsZ has a site where guanosine triphosphate (GTP) specifically binds [10]. When FtsZ forms the Z-ring, as shown in Fig. 1(b), GTP binds to the GTP binding site of FtsZ. Subsequently, the T3 loop of FtsZ coordinates to GTP to form a stable complex of FtsZ dimer, and a plurality of FtsZs polymerize at the GTP binding site. Finally, 20–30 FtsZs form into a fibrous aggregate [10]. Furthermore, the T7 loop site of FtsZ acts on GTP bound to the adjacent FtsZ to hydrolyze GTP into guanosine diphosphate (GDP). As a result, the arrangement of

* Corresponding author.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603
Received 18 January 2019; Received in revised form 16 June 2019; Accepted 11 November 2019
Available online 13 November 2019
0301-0104/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

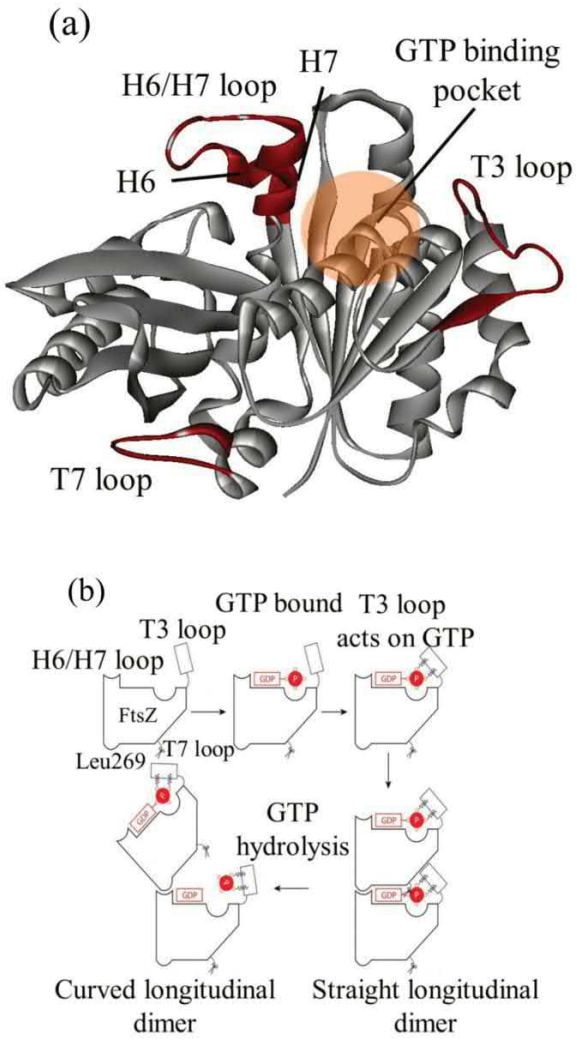


Fig. 1. (a) GTP binding pocket of FtsZ, and some loops (red) contributing to the formation of a fibrous aggregate of FtsZ [10], (b) Schematic picture of the formation mechanism of Z-ring by FtsZ proteins and GTP [10,11].

the T3 loop changes, and the conformation between the adjacent FtsZs changes significantly, causing a curved structure in the FtsZ aggregate and the shrinking of the Z-ring [11]. Therefore, by inhibiting the binding of GTP to FtsZ, the Z-ring formation can be prevented, and the division of Mtb cell can be suppressed.

In the present study, we adopted quinazoline derivatives, Zantrin Z3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine) and its dimethyl ZZ3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g] quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine), as inhibitors against FtsZ, and their binding properties with FtsZ were analyzed. Z3 was synthesized and investigated previously by Margalit *et al.*[7], while ZZ3 was developed based on Z3 [12]. These Zantrins inhibit the GTPase activity of FtsZ and are considered to prevent the generation of the Z-ring. Their half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) observed by the previous studies are 24 μM (Z3)[7] and 12 μM (ZZ3)[12], respectively. Therefore, the inhibitory effect of ZZ3 is larger than that of Z3, and the GTPase activity of FtsZ can be inhibited more efficiently than ZZ3. However, as shown in Fig. 1(a), since many ligand-binding sites exist on Mtb FtsZ, it is not elucidated where Z3 and ZZ3 bind to FtsZ. This fact is a bottleneck in developing

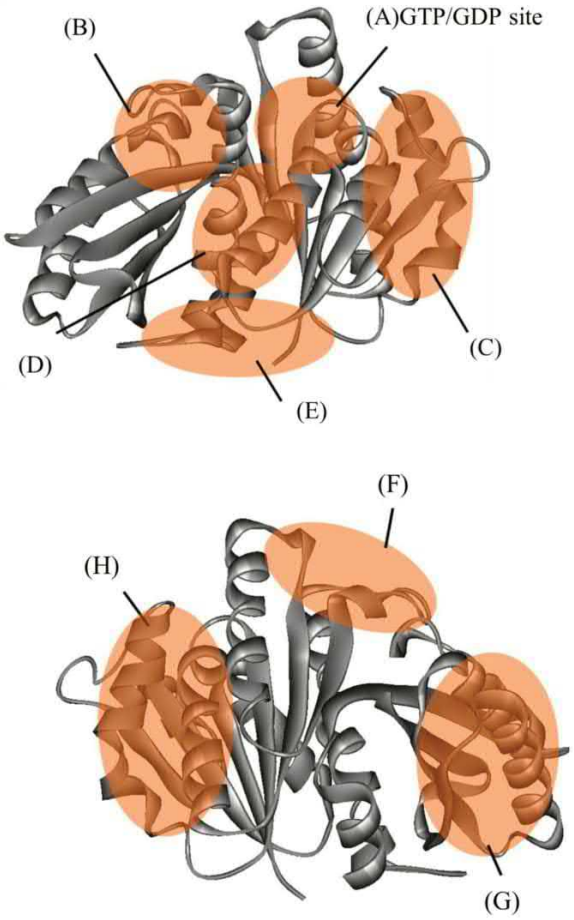


Fig. 2. Our proposed binding sites of inhibitors (Z3 and ZZ3) on FtsZ.

Table 1
Results of the first docking simulations for Z3 and ZZ3 to FtsZ; lowest binding energy (BE), number of poses, and docking site of ligand are listed for each of the clusters obtained by AutoDock4.2. The site A is the binding site of GTP and GDP [13]. The clusters with the number of poses larger than 10 are indicated by boldface.

	FtsZ + Z3			FtsZ + ZZ3		
Cluster	BE	Poses	Site	BE	Poses	Site
1	−3.74	87	G	−4.28	101	G
2	−3.37	10	C	−3.58	31	B
3	−3.21	40	E	−3.55	9	G
4	−2.94	42	B	−3.30	31	E
5	−2.75	30	A(GTP/GDP)	−3.16	13	D
6	−2.68	6	E	−3.16	5	E
7	−2.45	3	G	−3.14	15	A(GTP/GDP)
8	−2.45	5	D	−3.06	31	F
9	−2.44	1	D	−2.99	2	C
10	−2.33	15	F	−2.81	4	G
11	−2.31	3	H	−2.79	6	H
12	−2.21	2	E	−2.69	2	F
13	−2.16	2	H	–	–	–
14	−1.85	1	G	–	–	–
15	−1.78	1	G	–	–	–
16	−1.55	1	H	–	–	–
17	−1.27	1	G	–	–	–

Table 2
Number of poses distributed in each of the ligand-binding sites of FtsZ.

FtsZ + Z3		FtsZ + ZZ3	
Site	Poses	Site	Poses
G	93	G	114
E	48	E	36
B	42	F	33
A	30	B	31
F	15	A	15
C	10	D	13
D	6	H	6
H	6	C	2

more potent inhibitors against FtsZ.

In our present study, the binding sites of Z3 and ZZ3 to Mtb FtsZ were searched widely, using *ab initio* molecular simulations. Furthermore, the specific interactions between FtsZ and the inhibitors were analyzed precisely at an electronic level by *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. It reveals that Z3 and ZZ3 bind to the vicinity of the H6/H7 loop, not the GTP binding site of FtsZ. Therefore, it was elucidated for the first time that Z3 and ZZ3 have no effect on hydrolysis of GTP, but they are efficient against the aggregation of FtsZ. The present results will be useful for proposing novel anti-TB drugs disrupting the FtsZ aggregation.

2. Details of the present molecular simulations

2.1. Construction and optimization of FtsZ + Z3/ZZ3 complex

In the present study, we employed the X-ray crystal structure of Mtb FtsZ + GDP complex (PDB ID: 1RQ7 [13]) as the initial structure for FtsZ modelling. This PDB structure is a dimer of FtsZ composed of two subunits (chain-A and chain-B), and only chain-A has the complete ligand-binding pockets. Therefore it was employed as the initial structure for FtsZ modelling. The missing residues (from Arg64 to Ala68) in the PDB structure were completed using a protein modelling server I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) [14,15]. Among the five candidate models produced by I-TASSER, the model-1 was selected, because of its best C-score (1.86). FtsZ contains one His residue, and its protonated state was assigned based on the pKa value predicted by PROPKA3.1 program [16,17]. Since this His residue has a pKa value larger than 6 and is located on the surface of FtsZ, this His residue was assigned to have Hip^+ protonation. The N- and C-termini of FtsZ were terminated by the acetyl group, and the amine group, respectively.

As the inhibitors against FtsZ, we employed two Zantrins (Z3 and ZZ3). These inhibitors were found to inhibit the GTPase activity of FtsZ in the previous biochemical experiments [7,12]. Although their structures are similar as shown in Fig. S1 of the supporting information, their IC_{50} indicating inhibitory effects are different by 2 times; 24 μM (Z3)[7] and 12 μM (ZZ3)[12]. The reason for this significant difference in IC_{50} is still unknown. Their structures were optimized using the B3LYP/6-31G(d,p) method of the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian09 (G09) [18]. The charge distributions of the optimized structures were evaluated by the HF/6-31G(d) method of G09 and obtained the charge parameters in the molecular mechanics (MM) force field. These charge distributions were used for the protein–ligand docking simulations as well as the MM optimizations, in order to accurately describe the electrostatic interactions between FtsZ and its inhibitors.

Because FtsZ has several ligand-binding sites and it is not evident which site is more preferred by its inhibitors, it is needed to search widely for the inhibitor binding sites. We here conducted the following two steps of docking simulations, using the protein–ligand docking

Table 3
Results of the second docking simulations for (a) Z3 and (b) ZZ3 to FtsZ; lowest binding energy (BE) and number of poses are listed for each of the six clusters obtained by the first docking of Autodock4.2. The clusters with the largest number of poses are indicated by boldface.

(a)

1st	2nd	BE	Poses	1st	2nd	BE	Poses
1	**1**	**–4.06**	**86**	4	1	–3.80	16
	2	–3.64	8		2	–3.71	9
	3	–3.44	9		3	–3.57	14
	4	–3.44	9		4	–3.28	3
	5	–3.37	24		5	–3.15	1
	6	–3.22	43		**6**	**–3.08**	**57**
	7	–3.18	6		7	–3.02	2
	8	–3.13	4		8	–2.95	4
	9	–3.05	36		9	–2.92	28
	10	–3.02	1		10	–2.86	8
2	**1**	**–3.43**	**86**	5	1	–3.00	2
	2	–3.21	20		2	–2.88	2
	3	–3.20	6		**3**	**–2.62**	**28**
	4	–3.13	8		4	–2.62	23
	5	–3.02	16		5	–2.61	16
	6	–3.00	31		6	–2.50	26
	7	–2.88	30		7	–2.49	18
	8	–2.84	11		8	–2.49	25
	9	–2.81	2		9	–2.43	14
	10	–2.78	10		10	–2.40	2
3	**1**	**–3.45**	**69**	10	1	–2.59	23
	2	–3.26	60		**2**	**–2.59**	**30**
	3	–3.11	10		3	–2.50	6
	4	–3.04	8		4	–2.50	16
	5	–3.01	30		5	–2.49	22
	6	–2.93	4		6	–2.49	16
	7	–2.89	4		7	–2.48	18
	8	–2.80	19		8	–2.47	11
	9	–2.76	4		9	–2.43	26
	10	–2.73	3		10	–2.40	14

(b)

1st	2nd	BE	Poses	1st	2nd	BE	Poses
1	**1**	**–4.60**	**110**	5	**1**	**–3.90**	**52**
	2	–4.18	28		2	–3.35	15
	3	–4.17	18		3	–3.33	27
	4	–3.81	13		4	–3.18	1
	5	–3.78	2		5	–3.17	14
	6	–3.77	4		6	–3.12	5
	7	–3.70	23		7	–3.12	2
	8	–3.70	3		8	–3.11	1
	9	–3.65	4		9	–3.09	16
	10	–3.55	2		10	–3.09	1
2	1	–4.00	5	7	1	–3.54	4
	2	–3.89	62		2	–3.51	13
	3	–3.85	6		3	–3.44	15
	4	**–3.54**	**63**		4	–3.42	15
	5	–3.44	13		5	–3.41	23
	6	–3.37	11		6	–3.38	31
	7	–3.36	2		7	–3.33	2
	8	–3.34	1		8	–3.30	27
	9	–3.32	13		9	–3.29	14
	10	–3.31	2		10	–3.25	4
4	1	–3.75	29		11	–3.18	3
	2	–3.57	42		**12**	**–3.17**	**49**
	3	**–3.47**	**46**	8	**1**	**–3.23**	**72**
	4	–3.36	17		2	–3.22	1
	5	–3.30	5		3	–3.21	2
	6	–3.29	18		4	–3.13	9
	7	–3.28	3		5	–3.12	1
	8	–3.28	17		6	–3.11	27
	9	–3.25	8		7	–3.04	9
	10	–3.25	14		8	–3.01	26
					9	–3.01	22
					10	–2.99	10

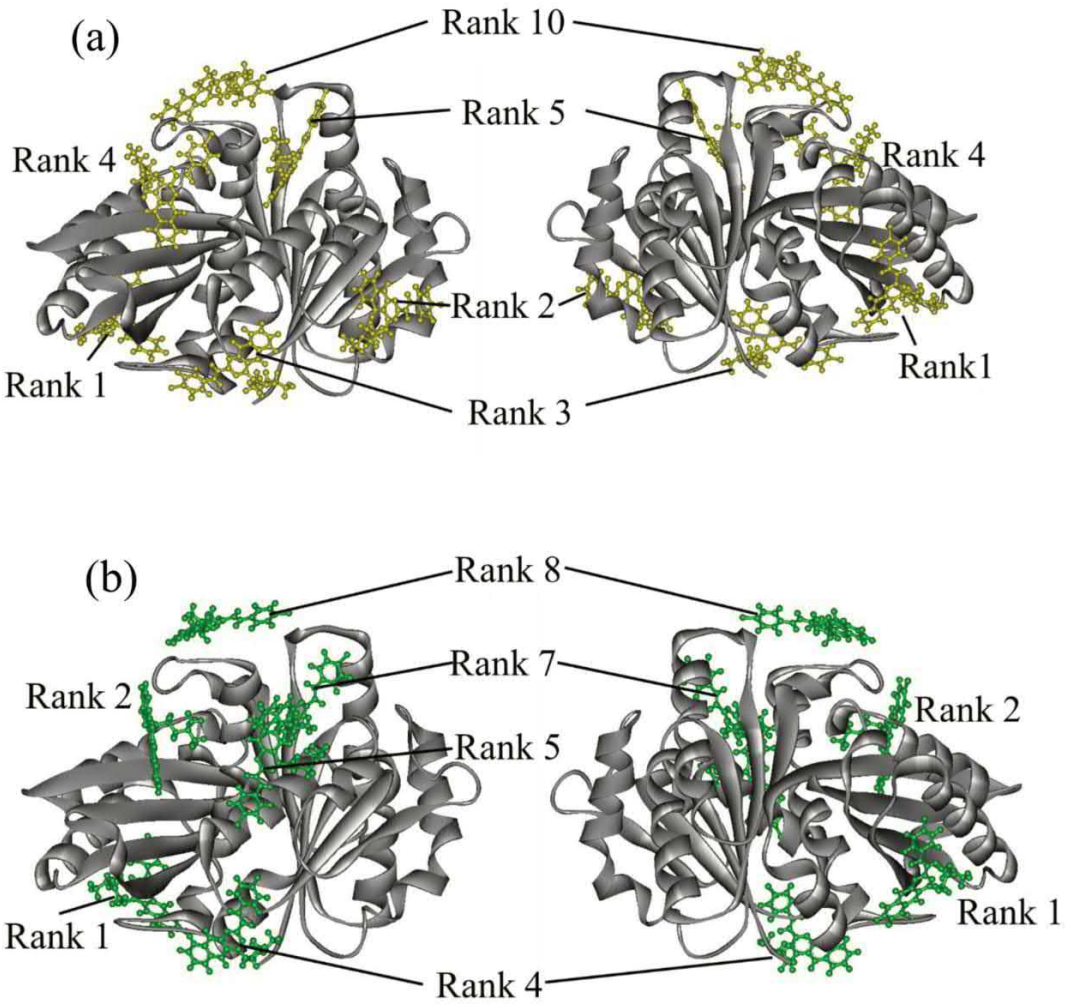


Fig. 3. Representative structures of ligands docked to FtsZ in each cluster generated by AutoDock4.2: (a) Z3 and (b) ZZ3.

Table 4
Total energy (TE: kcal/mol) of the FtsZ + Z3 and FtsZ + ZZ3 complexes calculated by *ab initio* FMO method; 1st and 2nd indicate the ranking of the first and the second dockings, respectively, and the sites of docking are shown in Fig. 2. The site A is the binding site of GTP and GDP [13]. The most stable structures of FtsZ + Z3 and FtsZ + ZZ3 are indicated by boldface.

Ligand	1st	2nd	TE	ΔTE	Site
Z3	Rank 1	Rank 1	−77197147.2	442.9	G
	Rank 2	Rank 1	−77197356.4	233.7	C
	Rank 3	Rank 1	−77197364.6	225.5	E
	Rank 4	**Rank 6**	**−77197590.1**	**0.0**	**B**
	Rank 5	Rank 3	−77197530.3	59.8	A(GTP/GDP)
	Rank 10	Rank 2	−77197064.0	526.2	F
ZZ3	Rank 1	Rank 1	−77148157.8	479.1	G
	Rank 2	**Rank 4**	**−77148636.9**	**0.0**	**B**
	Rank 4	Rank 3	−77148364.4	272.5	E
	Rank 5	Rank 1	−77148348.3	288.6	D
	Rank 7	Rank 12	−77148349.9	287.1	A(GTP/GDP)
	Rank 8	Rank 1	−77148116.5	520.4	F

program Autodock 4.2 [19], in the same way as our previous study on the FtsZ + curcumin complexes [20]. At the first step, we set the grid box of docking as the whole structure of FtsZ is covered, and Z3 and ZZ3 were docked to many sites on the entire surface of FtsZ. The size of the grid box was 59.85 × 59.85 × 59.85 Å^3, and the center of the box was set as the center of FtsZ. In the docking, the FtsZ structure was fixed, while the structure of inhibitor was freely relaxed, in order to obtain various conformations of ligand. The number of candidate poses was 250, and they were grouped into several clusters based on the similarity of their structures. The threshold distance for clustering the poses was set as 10 Å.

Subsequently, we conducted more detailed second-docking simulations for each of the docking sites obtained by the preliminary docking. As the candidate sites for the docking, we chose the representative structure in each of the clusters, which have more than 10 candidate poses in the first-docking. For each docking site, the grid box of docking was set as the center of gravity of the inhibitor in the representative structure, and the size of the grid box was set as approximately twice the size of the long axis of the inhibitor (30 × 30 × 30 Å^3). It is noted that the spacing between the adjacent grid points was set as 0.375 Å for

searching in detail the preferable binding site. The number of candidate poses was 250, and the threshold distance for clustering these poses was set as 2 Å. The docking was repeated for each of the candidate sites obtained by the first-docking, in order to produce many different candidate sites of the inhibitor docking.

To obtain stable structures of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes, all representative structures of the clusters obtained by the resulting docking simulations were fully optimized in water by use of the classical MM method. In the MM optimizations, about 1800 water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex were considered explicitly. The MM and molecular dynamics (MD) simulation program AMBER12 [21] was used. The AMBERFF99-SBLIN force field [22], the TIP3P model [23] and the general AMBER force field (GAFF) [24] were used for FtsZ, water molecules and inhibitors, respectively. The criterion for the convergence of structure optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å.

2.2. FMO calculations for FtsZ + Z3/ZZ3 complex

To elucidate the specific interactions and binding affinity between FtsZ and the inhibitor, we investigated the electronic properties of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes in explicit waters, using the *ab initio* FMO method [25]. This method has been applied for many biomolecules and obtained accurate results comparable to experiments. Water molecules can contribute specific protein–ligand interactions. To elucidate the contribution of this factor, all water molecules existing within 10 Å from the inhibitor were considered explicitly. The number of water molecules for the FMO calculations was unified as 150 for all complexes, in order to compare the total energies of the different solvated structures of the FtsZ + inhibitor complex and to determine the most stable structure.

To predict the binding affinity between FtsZ and its inhibitor, the binding energy (BE) between FtsZ and its inhibitor was estimated from the total energies (TEs) of the component structures using the following equation.

$$\mathrm{BE} = \mathrm{TE}(\mathrm{complex} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}(\mathrm{FtsZ} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}(\mathrm{inhibitor} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}(\mathrm{water})$$

In the FMO calculations, the MP2 [26,27]/6-31G method of the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [28] was used. Each amino acid residue of FtsZ, inhibitor and each water molecule were assigned to a fragment in the FMO calculations. This fragmentation enables us to analyze the interactions between each amino acid residue of FtsZ and inhibitor molecule affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important FtsZ residues for the inhibitor binding, we analyzed the inter fragment interaction energies (IFIE) [29] obtained by the FMO calculations.

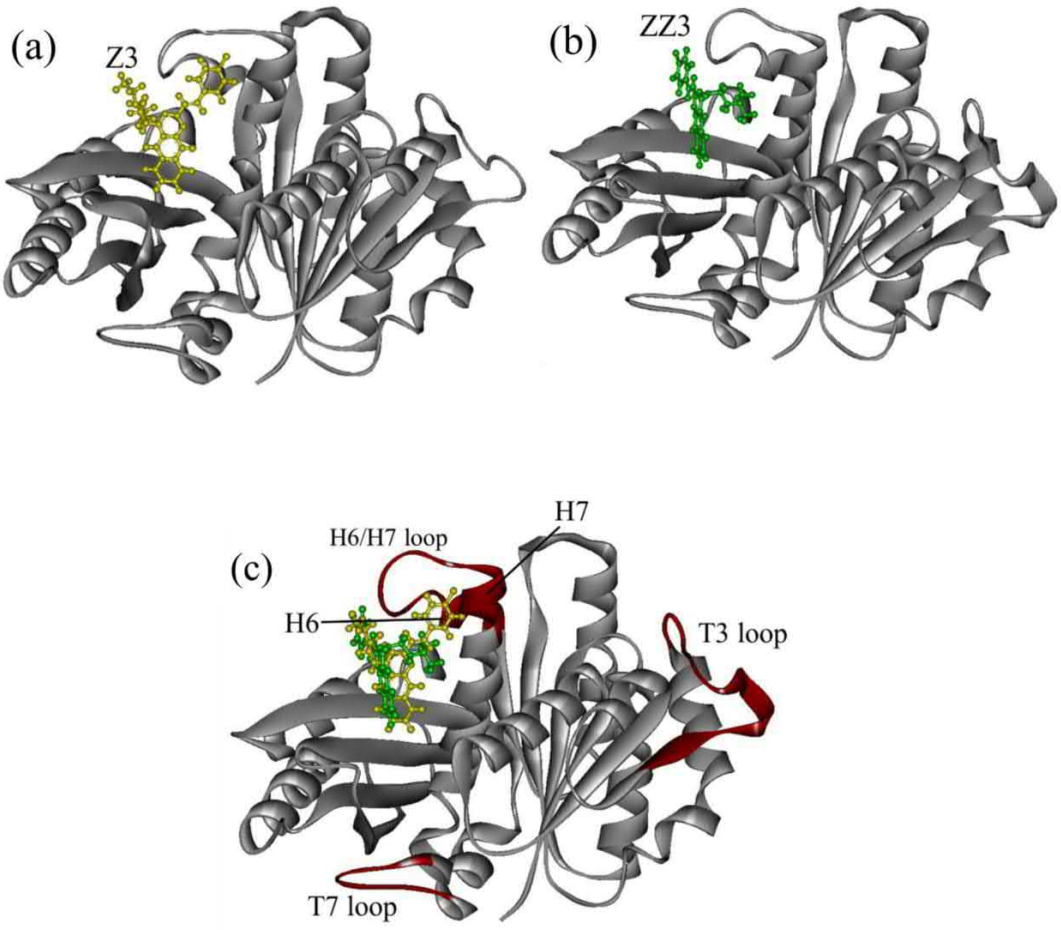


Fig. 4. Most preferable binding site of inhibitor to FtsZ determined by *ab initio* FMO calculations; (a) Z3, (b) ZZ3 and (c) comparison of binding sites of Z3 (yellow) and ZZ3 (green).

3. Results and discussion

3.1. Preferable binding sites of Z3 and ZZ3 inhibitors on FtsZ

Because the binding sites of the inhibitors Z3 and ZZ3 on FtsZ have not been clarified, we classified the possible binding sites into the eight sites as shown in Fig. 2. First of all, GTP/GDP site of the FtsZ + GDP complex (PDB ID: 1RQ7 [13]) was assigned as the A-site. In addition, since our preliminary docking simulations of Z3 and ZZ3 to the whole structure of FtsZ predicted seven candidate binding-sites, these sites were defined as B, C, D, E, F, G and H on FtsZ, as shown in Fig. 2

In the first-docking simulations, we docked the inhibitors to the whole structure of FtsZ and searched widely for the inhibitor binding sites on FtsZ. The 250 candidate structures created by AutoDock 4.2 were grouped into 17 clusters for FtsZ + Z3 and 12 clusters for FtsZ + ZZ3, respectively. Table 1 lists the lowest binding energy (BE), number of poses and the site of docking for each cluster created by AutoDock 4.2. Ranking of these clusters was determined by the BEs evaluated by the program. The larger number of poses for each cluster is expected to indicate the higher probability that inhibitor binds to the site of the cluster. As listed in Table 1, among the 17 clusters of FtsZ + Z3, the number of poses in the Rank-1 cluster is the largest (87 poses), in which Z3 binds to the G-site of FtsZ shown in Fig. 2. On the other hand, for the FtsZ + ZZ3 complex, the Rank-1 cluster contains the largest number of poses, and ZZ3 binds to the G-site. Therefore, both Z3 and ZZ3 were found to have a high probability of binding to the G-site of FtsZ by the docking simulations to the whole structure of FtsZ. Table 2 lists the number of poses bound to each binding-site of FtsZ shown in Fig. 2. Among the 250 candidate poses of FtsZ + Z3, the 93 poses contain Z3 at the G-site, while ZZ3 binds to the G-site in the 114 poses created by AutoDock 4.2.

Subsequently, in the second-docking simulations, we selected the representative structures in the clusters, which have more than 10 candidate poses in the first-docking, and the inhibitor was docked to each of the docking sites of the structures. There are 6 clusters having more than 10 poses for the FtsZ + Z3 complex in the first docking. We selected these 6 clusters and docked Z3 to each of their representative structures, using a smaller and more detailed grid box. Similarly, we selected the 6 clusters for FtsZ + ZZ3 and docked ZZ3 to these 6 different potential sites of FtsZ.

For each of these 6 clusters obtained by the first docking, 250 candidate poses were created by the second docking simulations. These poses were grouped into 20–50 clusters, each of which has a slightly different conformation of the inhibitor. Table 3(a) lists only the top ranked 10 clusters in the second docking, indicating that the higher ranked clusters prefer to contain a larger number of candidate poses. Among the 10 clusters listed in Table 3(a), we selected the cluster with the largest number of poses in the second docking. The selected clusters are indicated by bold face. Similar docking simulations were carried out for FtsZ + ZZ3, and the results are listed in Table 3(b). In only the second docking to the Rank 7 cluster obtained by the first docking, the 12th ranked cluster has the largest number of poses. Among these created structures, we selected the cluster with the largest number of poses obtained by the second docking.

Using the two step docking simulations, we can obtain 6 different docking sites on FtsZ for Z3 and ZZ3, respectively. It is noted that the ranking based on the lowest binding energy obtained by AutoDock 4.2 has a possibility of causing an error in ranking, because the energy is not accurately calculated by the *ab initio* molecular orbital method. In the present study, we optimized the candidate structures of FtsZ + Z3/ZZ3 in water by classical MM method, and finally the total energies of the optimized structures were precisely calculated by the *ab initio* FMO method to determine the most stable structure of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes.

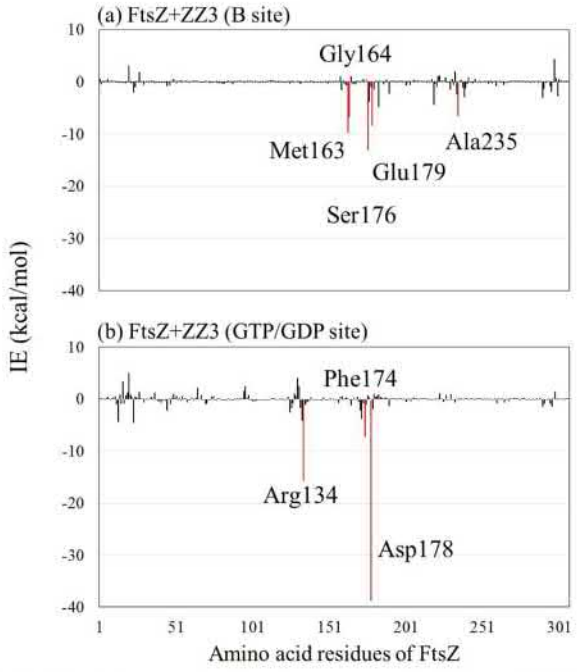


Fig. 5. Interaction energy (IE) between FtsZ residues and ZZ3; (a) ZZ3 is docked to the B site, (b) ZZ3 is docked to the GTP/GDP binding site.

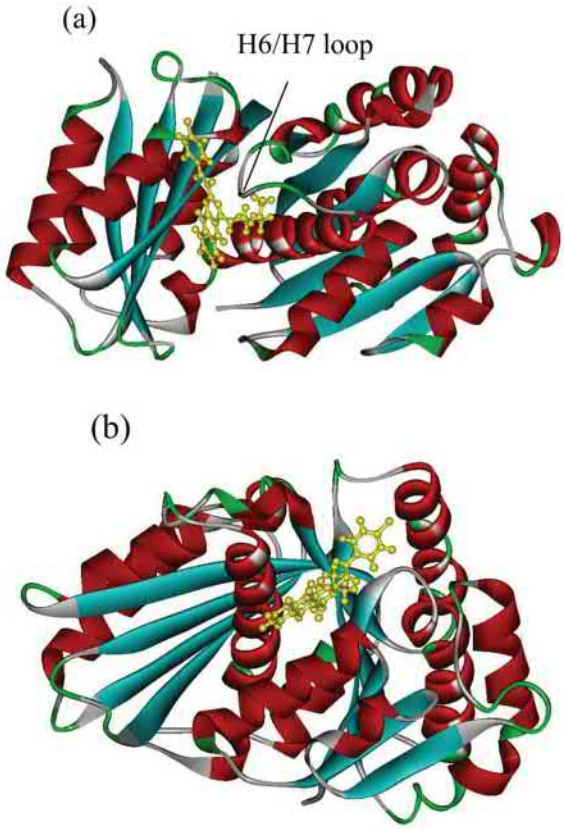


Fig. 6. Structures of the FtsZ + ZZ3 complex; (a) ZZ3 is docked to the B site, (b) ZZ3 is docked to the GTP/GDP binding site.

The candidate structures of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes obtained by the two step docking simulations were optimized in water using AMBER MM simulations, with considering all water molecules in 8 Å distance from the complex structure. Fig. 3(a) shows the optimized structures of FtsZ + Z3. In the structure of Rank 1, Z3 binds to the G-site on the backside of FtsZ, while Z3 in Rank 2 binds to the C-site. The Z3 in Rank 3, Rank 4, Rank 5 and Rank 10 binds to the region close to E-site, B-site (including H6/H7 loop), GTP/GDP site (A-site) and the F-site of FtsZ, respectively. Fig. 3(b) shows the binding sites of ZZ3 to FtsZ. Rank 1 binds near the G-site, while Rank 2 binds to the B-site including the H6/H7 loop. Rank 4 binds to the E-site located at the lower part of FtsZ, while Rank 5 binds to the D-site at the center of FtsZ, Rank 7 binds to the GTP/GDP site, and Rank 8 binds to the F-site of FtsZ. Therefore, by use of the above mentioned two-step docking simulations, we predict many different candidate structures of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes.

3.2. Electronic properties of FtsZ + Z3/ZZ3 complexes

In order to determine the most preferable binding site of Z3/ZZ3 on FtsZ, it is indispensable to calculate accurately the total energy of the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes. We therefore employed the *ab initio* FMO method to evaluate the total energies. As listed in Table 4, among the six structures of the FtsZ + Z3 complex, the structure of Rank 4 of the first-docking was predicted as the most stable and at least 59.8 kcal/mol more stable than the other structures. In contrast, the Rank 2 structure of FtsZ + ZZ3 was predicted as the most stable. Therefore, the structures indicated by boldface in Table 4 are expected to the most preferable in the view points of total energy. It is noted that both Z3 and ZZ3 prefer to bind to FtsZ in the same B-site and not in the site of GTP/GDP binding, indicating that Z3 and ZZ3 have no significant effect on the GTPase activity of FtsZ. The most preferable binding positions of Z3 and ZZ3 on FtsZ were compared in Fig. 4 indicating that both inhibitors bind in a similar way near the H6/H7 loop of FtsZ and induce a change in its conformation.

To clarify which one of Z3 or ZZ3 binds more strongly to mycobacterial FtsZ, we compared the binding energies (BEs) between FtsZ and its inhibitors (Z3 and ZZ3), using the *ab initio* FMO calculations for the most stable structure of each complex. The BEs evaluated are −41.5 (Z3) and −55.1 kcal/mol (ZZ3), as listed in Table S1 of the supporting information, indicating that ZZ3 binds more strongly with FtsZ than Z3. This trend of binding affinity of Z3 and ZZ3 is consistent with the trend in the IC_{50} values obtained by the experiments [7,12], which revealed stronger affinity of ZZ3 than Z3. It is therefore confirmed that our molecular-docking and *ab initio* FMO calculations can be used for predicting the interactions between FtsZ and its inhibitors Z3 and ZZ3.

In the previous experimental study [13], some inhibitors, which bind specifically to the GTP/GDP binding site of FtsZ, were proposed as potent inhibitors of its GTPase activity. In contrast, our present study highlighted the possibility that Z3 and ZZ3 bind to the alternative B-site shown in Fig. 2 rather than the GTP/GDP binding site of FtsZ. To elucidate the reason for this specific binding of Z3 and ZZ3 to the B-site, we investigated the interaction energies (IEs) between the FtsZ residues and ZZ3 by the FMO method. Fig. 5(a) shows the IEs between the FtsZ residue and ZZ3, when ZZ3 binds to the B-site. The five residues (Met163, Gly164, Ser176, Glu179 and Ala235) were found to have large attractive IEs with ZZ3. On the other hand, when ZZ3 binds to the GTP/GDP binding site, ZZ3 strongly binds to the charged Asp178 and Arg134 as shown in Fig. 5(b). However, ZZ3 bound to the GTP/GDP site has no other residues with large attractive IEs. Furthermore, several residues of this site demonstrate repulsive interactions with ZZ3. As a result, ZZ3 binds more preferably to the B-site than the GTP/GDP site.

Furthermore, to elucidate the difference in the binding mode of ZZ3 to the both sites, we compared the optimized structures of the FtsZ + ZZ3 complex. As shown in Fig. 6(a), when ZZ3 binds to the B-site, the H6/H7 loop of FtsZ changes its conformation to cover over ZZ3, resulting in stronger attractive interacts between ZZ3 and the FtsZ residues as shown in Fig. 5(a). In contrast, as it presented in Fig. 6(b), ZZ3 bound to the GTP/GDP site interacts with only some residues, due to the absence of loop domain to cover ZZ3. Accordingly, it might be possible to create novel derivatives based on ZZ3, which bind more strongly to the B-site of FtsZ.

The B-site of FtsZ exists near the H6/H7 loop, which is important for forming fibrous aggregates of FtsZ [11], as indicated in Fig. 1(b). Fig. 6(a) elucidates that the binding of ZZ3 to the B-Site induces a conformational change of the H6/H7 loop and may prevent the formation of the fibrous aggregates of FtsZ. Consequently, the present molecular simulations clarified that ZZ3 as well as Z3 have a potential as an inhibitor against the formation of FtsZ aggregates. In order to reveal the effect of ZZ3/Z3 binding on the conformation of the H6/H7 loop, MD simulations are underway now for the solvated structures of FtsZ + ZZ3/Z3 complexes, using the same force fields of AMBER12 [21] as the MM optimizations. These MD simulations are very time-consuming and the results will be published elsewhere.

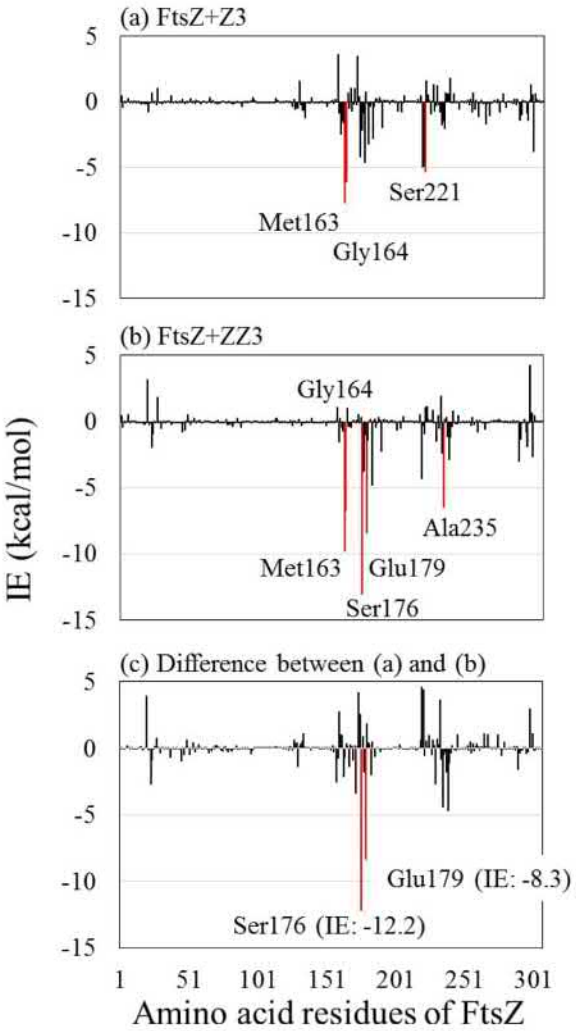


Fig. 7. Interaction energy (IE) between FtsZ residues and inhibitor evaluated by *ab initio* FMO calculations; (a) Z3, (b) ZZ3, (c) difference between (a) and (b).

3.3. Specific interactions between FtsZ residues and Z3, ZZ3

To elucidate the reason for the larger BE for ZZ3 compared with Z3, we investigated the IEs between FtsZ residues and ZZ3 or Z3 by the FMO method. As shown in Fig. 7(a), Z3 interacts strongly with Met163, Gly164 and Ser221, while ZZ3 interacts strongly with Met163, Gly164, Ser176, Glu179 and Ala235, as shown in Fig. 7(b). To clarify the difference in the binding properties between FtsZ and Z3/ZZ3, we analysed the difference in IEs for Z3 and ZZ3. As shown in Fig. 7(c), the IE between ZZ3 and Ser176 is 12.2 kcal/mol larger than that of Z3, and the IE between ZZ3 and Glu179 is 8.3 kcal/mol larger than that of Z3. It is thus elucidated that the difference in IEs with these FtsZ residues is a main reason of the difference in binding strength to FtsZ between ZZ3 and Z3. As shown in Fig. S2 of the supporting information, Ser176 and Glu179 belong to the H7 domain. Therefore, the binding of ZZ3 to the B-site is expected to cause change in the conformation of H7 and affect the FtsZ aggregation.

To elucidate the reason for the difference in interaction energies shown in Fig. 7, we furthermore examined in detail the interacting structures between some FtsZ residues and the inhibitors. As indicated in Fig. S3(a) of the supporting information, Z3 interacts electrostatically with the oxygen atom of the main chain of Met163 contained in the H6/H7 loop at the distances of 3.5 and 3.7 Å. As a result, Z3 has strong (−7.7 kcal/mol) attractive interaction with Met163 as shown in Fig. 7(a). In addition, Z3 interacts with the oxygen atom of the main chain of Gly164 contained in the H6/H7 loop at the distances of 3.2 and 2.6 Å, and the IE between Z3 and Gly164 is − 6.1 kcal/mol. Also, Z3 interacts with the oxygen atoms of the main and the side chains of Ser221 at distances of 2.5 and 3.2 Å, to produce the IE of −5.4 kcal/mol between Z3 and Ser221.

Fig. S3(a) of the supporting information also indicates that Z3 binds to the pocket containing the H6/H7 loop, H6 and H7, and the H6/H7 loop change its conformation to cover over Z3. As a result, the pocket is closed, and several attractive interactions are formed between the FtsZ residues (Met163 and Gly164) and Z3. As revealed in Fig. 1(b), the H6/H7 loop is important for the FtsZ aggregation [10,11]. Therefore, as demonstrated in Fig. S3(a) of the supporting information, the binding of Z3 to this site induces the change in conformation of the H6/H7 loop to cause inhibition of FtsZ aggregation. In the previous study [12], some inhibitors targeting the GTP/GDP site of FtsZ were developed. However, our present study has discovered that compounds targeting the H6/H7 loop may also be effective inhibitors of FtsZ aggregation.

ZZ3 binds to the B-site of FtsZ in a different way from Z3, as shown in Fig. S3(b) of the supporting information. ZZ3 interacts electrostatically with the oxygen atom of the main chain of Met163 resulting in strong attractive interaction (−9.8 kcal/mol). Furthermore, the nitrogen atom of the six-membered ring interacts with the hydrogen atom of Gly164 contained in the H6/H7 loop at a distance of 2.1 Å, resulting in the IE of −6.7 kcal/mol between ZZ3 and Gly164. In addition, the other nitrogen atom of the group marked by a red-circle in Fig. S3(b) of the supporting information has a strong electrostatic attractive interaction with the hydrogen atom of Ser176 at a distance of 2.0 Å, resulting in an large IE of − 13.1 kcal/mol. ZZ3 also interacts with the oxygen atom of the side chain of Glu179 contained in H7 at a distance of 4.1 Å, and the IE is −8.4 kcal/mol. In this way, ZZ3 binds strongly to the pocket containing the H6/H7 loop, H6 and H7 domains, and the conformation of the H6/H7 loop changes to cover over ZZ3.

The comparison of Figs. S3(a) and S3(b) of the supporting information also elucidates that the directions of the binding of Z3 and ZZ3 to FtsZ are the opposite to each other. This is likely to come from the difference of the group marked by a red circle in Figs. S3(a) and S3(b). The benzene ring of Z3 approaches H7, while the red-marked group is located away from H7. In contrast, as shown in Fig. S3(b), the red-marked group of ZZ3 is located near H7, and the nitrogen atom of the group interacts strongly with Ser176 at 2.0 Å distance. Furthermore, ZZ3 interacts with Glu179 contained in H7 at a closer distance than Z3. Consequently, it was revealed that the binding modes of Z3 and ZZ3 to H7 are significantly different, because of the difference in structure of the red-marked group, as shown in Figs. S3(a) and S3(b).

To reveal the reason why the difference in Z3 and ZZ3 structures causes the remarkable difference in the binding modes of Z3 and ZZ3, we analysed in details the results of the docking simulations for the both inhibitors to FtsZ. At first, from the candidate structures for FtsZ + Z3 created by the docking simulations, we selected a structure with Z3 docked to FtsZ in the same orientation as ZZ3 and analysed the specific interactions between Z3 and FtsZ, using the MM and the FMO calculations. Indeed, from the candidate structures shown in Table 3(a), we selected the representative structure of the Rank 3 (second-docking) for the Rank 4 (first-docking) and compared it with the structure of the most stable Rank 6 (second-docking). The TEs and BEs for the two structures (Table S2 of the supporting information) indicate that the complex, in which Z3 binds to FtsZ in the same direction as ZZ3, is 19.5 kcal/mol less stable, and that its BE is 6.7 kcal/mol smaller than that for the most stable structure (Rank 6). To elucidate the reason for this difference, the IEs between Z3 and FtsZ residues were investigated. It was revealed in Fig. 8 that Z3 interacts strongly with Met163, Gly164,

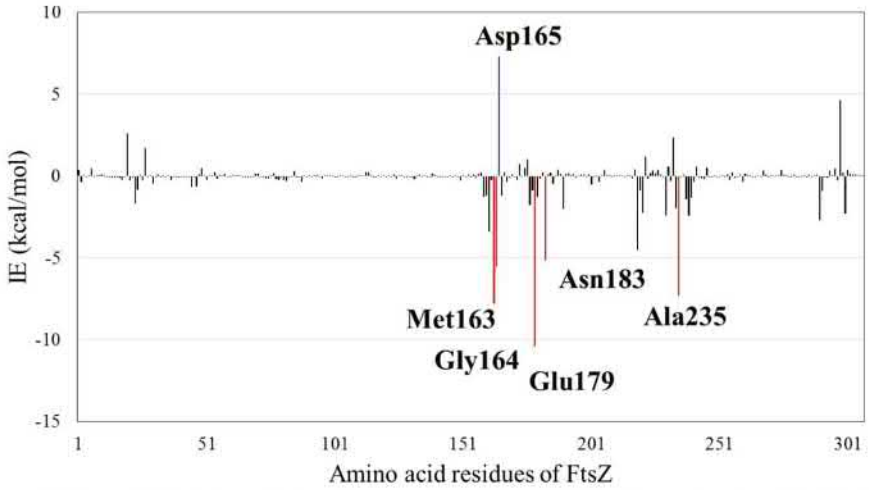


Fig. 8. Interaction energy (IE) between FtsZ residues and Z3 for the structure in which Z3 is docked in the same direction as ZZ3 in the FtsZ + ZZ3 complex.

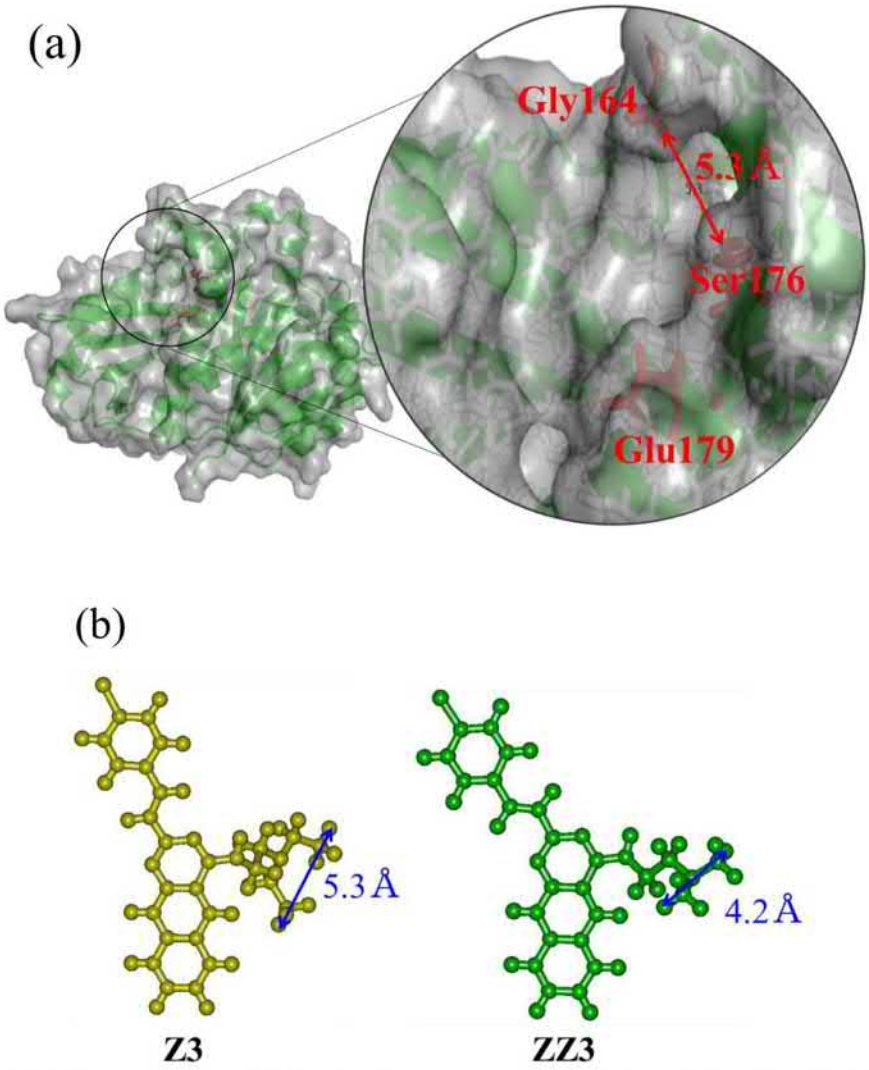


Fig. 9. Comparison of the ligand binding pocket (B-site in Fig. 4) of FtsZ and the structure of inhibitor Z3 and ZZ3. (a) The pocket at the B-site of FtsZ. The red arrow indicates the closest distance between the atoms of Gly164 and Ser176. (b) The size of groups different in Z3 and ZZ3 inhibitors.

Glu179, Asn183 and Ala235 of FtsZ, while Z3 interacts repulsively with the negatively charged Asp165. Furthermore, we analysed the interacting structure between Z3 and FtsZ residues. As shown in Fig. S4(a) of the supporting information, Z3 interacts with the oxygen atoms of the main chain of Met163 as well as Gly164. Both residues are contained in the H6/H7 loop. Glu179, Asn183 and Ala235 also interact electrostatically with Z3 to contribute the binding between Z3 and FtsZ. In contrast, Fig. S4(b) of the supporting information indicates that the hydrogen atom at the side chain of the positively charged Asp165 interacts repulsively with Z3 at distances of 3.5 and 3.7 Å, resulting in an IE of 7.3 kcal/mol between Z3 and Asp165. This is a main reason of the small binding energy between Z3 and FtsZ in this structure.

Finally, to clarify the reason for the difference in binding modes of Z3 and ZZ3 to FtsZ, we compared the ligand binding pocket (B-site in Fig. 2) of FtsZ and the structures of Z3 and ZZ3. As shown in Fig. 9(b), only the group on the right side of Z3 and ZZ3 is different, and the size of the group in ZZ3 is smaller than that of Z3. We also checked the size of the ligand-binding pocket of FtsZ, which is composed of Gly164 and Ser176 residues. As shown in Fig. 9(a), the shortest distance between the hydrogen atom of Gly164 and the oxygen atom of Ser176 is 5.3 Å. This size is likely to be the maximum size of the group, which can enter into the ligand binding pocket of FtsZ. The group of the right side of ZZ3 in Fig. 9(b) is expected to enter into this pocket, since the size is 4.2 Å. Therefore, this group of ZZ3 can enter into the pocket of the B-site and bind strongly with the FtsZ residues, as shown in Fig. S3(b) of the supporting information. On the other hand, since Z3 has a large (5.3 Å) group, as indicated in Fig. 9(b), this group of Z3 cannot enter the pocket of the B-site, as shown in Fig. S3(a), and it is not easy for Z3 to enter into the ligand-binding pocket at the B-site in the same manner as ZZ3. As a result, Z3 and ZZ3 bind to FtsZ in different binding modes as shown in Figs. S3(a) and S3(b), and ZZ3 binds more strongly to FtsZ than Z3.

From the above mentioned structural analysis, we can propose more potent inhibitors against FtsZ by adjusting the size of the group on the right side of ZZ3 (Fig. 9(b)) to be fitted to the ligand-binding pocket of FtsZ. Several novel inhibitors were proposed, and their binding properties with FtsZ are investigating now. The results will be published elsewhere.

4. Conclusions

To propose potent inhibitors against FtsZ, we employed Zantrin Z3 and ZZ3 and investigated their specific interactions with *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. By use of a protein–ligand docking simulations and classical MM optimizations in water, the binding sites of Z3 and ZZ3 were widely searched over the entire structure of FtsZ to produce sufficient number of candidate structures for the FtsZ + Z3/ZZ3 complexes. Our analysis of their electronic properties by *ab initio* FMO calculations allow us to determine precisely the most stable structures at an electronic level. These results elucidate the following features of Z3 and ZZ3 interactions with FtsZ and clarify important structural difference in binding of these two Zantrins.

(1) Z3 and ZZ3 prefer to bind to the B-site containing the H6/H7 loop and H7 not to the GTP/GDP binding site of FtsZ.
(2) ZZ3 has a higher binding affinity to FtsZ than Z3, being consistent with the trend of the IC_{50} of Z3 and ZZ3 observed by the previous experiments [7,12].
(3) Met163, Gly164, Ser176, Glu179 and Ala235 of FtsZ contribute to the ZZ3 binding.
(4) Z3 and ZZ3 are effective for inhibiting the aggregation of FtsZ, by changing the conformation of the H6/H7 loop contributing to the aggregation.
(5) Based on ZZ3, more potent inhibitors can be proposed, which bind more strongly to the H6/H7 loop of FtsZ.

Acknowledgements

This collaboration study was carried out under the student exchange program between the Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology. This study was supported by the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO), the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of the National Academy of Sciences of Ukraine, and The Nitto Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603.

References

[1] World Health Organization: "Global tuberculosis report, 2017".
[2] World Health Organization Media Centre: "WHO. Fact sheet: Tuberculosis", 2017.
[3] H. Nagai, Present status of multidrug resistant tuberculosis, Iryo (in Japanese) 58 (2004) 595–598.
[4] H. Kobayashi, K. Koyanagi, O. Kato, T. Oe, Outbreak of extensively drug-resistant pulmonary tuberculosis in a hemodialysis facility, Kekkaku (in Japanese) 88 (2013) 477–484.
[5] P.A. Karpov, O.M. Demchuk, V.M. Britsun, D.I. Lytvyn, N.O. Pydiura, A.V. Rayevsky, D.A. Samofalova, S.I. Spivak, D.M. Volochnyuk, A.I. Yemets, Y.B. Blume, New imidazole inhibitors of mycobacterial FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in grid to in vitro verification, Sci. Innov. 12 (2016) 43–55.
[6] H. Tomioka, Prospects for the development of new antituberculous drugs putting our hopes on new drug targets, Kekkaku (in Japanese) 85 (2010) 815–822.
[7] D.N. Margalit, L. Romberg, R.B. Mets, A.M. Hebert, T.J. Mitchison, M.W. Kirschner, D. RayChaudhuri, Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality, PNAS 101 (2004) 11821–11826.
[8] M. Osawa, H.P. Erickson, D.E. Anderson, Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes, Science 320 (2008) 792–794.
[9] D.J. Haydon, N.R. Stokes, R. Ure, G. Galbraith, J.M. Bennett, D.R. Brown, P.J. Baker, V.V. Barynin, D.W. Rice, S.E. Sedelnikova, J.R. Heal, J.M. Sheridan, S.T. Aiwale, P.K. Chauhan, A. Srivastava, A. Taneja, I. Collins, J. Errington, L.G. Czaplewski, An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-Staphyloccocal aureus activity, Science 321 (2008) 1673–1675.
[10] A. Desai, T.J. Mitchison, Microtubule polymerization dynamics, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13 (1997) 83–117.
[11] Y. Li, J. Hsin, L. Zhao, Y. Cheng, W. Shang, K.C. Huang, H.W. Wang, S. Ye, FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation, Science 341 (2013) 392–395.
[12] G.M. Nepomuceno, K.M. Chan, V. Huynh, K.S. Martin, J.T. Moore, T.E. O'Brien, L.A.E. Pollo, F.J. Sarabia, C. Tadeus, Z. Yao, D.E. Anderson, J.B. Ames, J.T. Shaw, Synthesis and evaluation of quinazolines as inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ, ACS Med. Chem. Lett. 6 (2015) 308–312.
[13] A.K. Leung, E.L. White, L.J. Ross, R.C. Reynolds, J.A. DeVito, D.W. Borhani, Structure of mycobacterium tuberculosis FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches, J. Mol. Biol. 342 (2004) 953–970.
[14] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, Nat. Protocols. 5 (2010) 725–738.
[15] A. Roy, J. Yang, Y. Zhang, COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation, Nucl. Acids Res. 40 (2012) 471–477.
[16] C.R. Søndergaard, M.H.M. Olsson, M. Rostkowski, J.H. Jensen, Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values, J. Chem. Theory Comp. 7 (2011) 2284–2295.
[17] M.H.M. Olsson, C.R. Søndergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, J. Chem. Theory Comp. 2 (2011) 525–537.
[18] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R.Cheeseman, G. calmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M.Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L.Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T.Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E.Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N.Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B.Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O.Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K.Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S.Dapprich, A.D.Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J.Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.M.J. Frisch, et al., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[19] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[20] M. Fujimori, H. Sogawa, S. Ota, P. Karpov, S. Shulga, Y. Blume, N. Kurita, Specific interactions between mycobacterial FtsZ protein and curcumin derivatives: molecular docking and *ab initio* molecular simulations, Chem. Phys. Lett. 692 (2018) 166–173.
[21] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.A.K.W. Leung, E.L. White, L.J. Ross, R.C. Reynolds, J.A. Devito, D.W. Borhani, Structure of Mycobacterium tuberculosis FtsZ Reveals Unexpected, G protein-like Conformational Switches, J. Mol. Biol. 342 (2004) 953 – 970.
[22] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, Protein 78 (2010) 1950–1958.
[23] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, M.L. Klein, Compatison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[24] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[25] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayashi, Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 701–706.
[26] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, A parallelized integral-direct second-order Møller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442–452.
[27] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.
[28] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Tagushi, S. Tanaka, Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. ACC. 130 (2011) 515–530.
[29] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, S. Tanaka, Intra- and inter-molecular interactions between cyclic-AMP receptor protein and DNA: *Ab initio* fragment molecular orbital study, J. Comp. Chem. 27 (2006) 948–960.

РОЗДІЛ 5
МЕХАНІЗМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ КУРКУМІНУ І ЙОГО ПОХІДНИХ З АМІЛОЇДНИМИ ПЕПТИДАМИ У МОДЕЛЯХ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В розділі V представлено результати досліджень *in silico* взаємодії куркуміну і його похідних з β-амілоїдним пептидом, сайтами рестрикції АβРР, Tau та FtsZ протеїном та експериментально встановлено безпосередній пригнічувальний ефект куркуміну на концентрацію ендогенного Aβ40 та цитокінів TNFα і IL-6, за умов токсичної дії агрегатів Aβ42. AD викликана накопиченням β-амілоїдних пептидів у мозку людини. Aβ пептиди утворюються як шляхом розщеплення β-секретазою, так і γ-секретазою білка-попередника амілоїду (APP). Для придушення продукції цих патогенних пептидів необхідно мати інгібітори процесу розщеплення APP, сполуки, які специфічно зв'язуються з місцем розщеплення APP та інгібують атаки γ-секретази. Двоступеневим розщепленням APP β- та γ-секретазами, утворюються Aβ пептиди, що мають 37–43 амінокислотні залишки. 28 залишків у пептиді належать до позаклітинного домену, тоді як інші залишки належать до мембранного домену. Aβ42 та Aβ40 утворюються з розщеплення APP γ-секретазою в місцях Ala713 та Val711, відповідно. Утворення пептидів Aβ42 та Aβ40 запобігається шляхом зв'язування інгібіторів із сайтом розщеплення APP γ-секретазою. Дослідження стабільних структур комплексів (APP + куркумін) у воді виявили, що куркумін I зв'язується з APP таким чином, що покриває сайт розщеплення APP γ-секретазою і може завадити розщепленню APP. Взаємодію можна посилити шляхом введення деяких груп в центральну частину куркуміну I. Визначено, що куркумін VI має найбільшу енергію зв'язування з APP серед запропонованих похідних куркуміну. Похідні куркуміну також зменшують можливість вироблення патогенного пептида Aβ42, зокрема куркумін VI, що охоплює сайт Ala19 APP, може бути інгібітором утворення Aβ42 і куркумін XIV, що зв'язується з APP та взаємодіє електростатично із залишком APP Ala19 і

потенційно може захистити місце розщеплення Ala19 APP від атаки γ-секретази. Природні сполуки із спорідненістю до зв'язування з Aβ – кверцетин (−)-епігаллокатехин галлат – EGCG, апігенін і куркумін-I було досліджено як інгібітори-кандидати Aβ агрегації. Показано, що енергія взаємодії куркуміну-Ib з Aβ набагато більша ніж у інших інгібіторів. Основною причиною є сильна взаємодія між куркуміном-Ib та Lys16. Проведено молекулярний докінгу куркуміна з трьома сайтами рестрикції AβPP для α-, β- і γ-секретаз, відповідно. Побудовано моделі фрагменту AβPP з 63 залишків (AβPP_63Rat: I_{661}-L_{723}), який включав усі сайти рестрикції і Aβ. Відібрано дві моделі, які мали кращі показники конформаційних і енергетичних коливань. Відібрано три сайти ензимної рестрикції AβPP_63Rat: I– M11-D12; II – K27-L28; III – V51-I52. Докінг куркуміну з AβPP_63Rat, який вміщував всі три сайти протеолізу, показав можливість утворення стійких комплексів між куркуміном та I і II сайтами рестрикції протеїну попередника Aβ. Показано, що куркумін втручається у процес утворення Aβ мономерів шляхом взаємодії з сайтами ензимного протеолізу AβPP. Досліджено специфічні взаємодії між Tau білком та куркуміном і його похідними 2B, 2C, 3A, 3E and PE859. З'ясовано, з якими з цих похідних Tau білок зв'язується сильніше і це може пригнічувати йго агрегацію. Ланцюг мономера A у Tau – філаменті (PDB ID: 5O3L) використовували як початкову структуру Tau білка, ефект сольватації білка моделювали молекулами води шаром 8 Å навколо нього. Енергія взаємодії (BE) між куркуміном та його похідними і Tau білком вираховували із сумарних енергій (TE) складових комплекса. Показано, що PE 859 має найнижчу BE серед досліджених похідних. Через групу піразолів у центрі PE 859 зв'язується з багатьма залишками амінокислот білка Tau. Модифікація індольного кільця PE 859 призводить до посилення взаємодії з Tau білком. Для моделювання FtsZ використовували як вихідну структуру Mtb FtsZ плюс цитратний комплекс (PDB ID: 1RQ2). Ця структура FtsZ – димер складений з двох субодиниць (ланцюг-A та ланцюг-B). Структуру ланцюга-A використовували як початкову структуру FtsZ, і ця структура мала відповідні сайти зв'язування і кишені для ліганда – куркуміни I, II та III. Для отримання стабільних структур комплексу FtsZ і структур кандидатів,

проведено оптимізацію у воді за допомогою класичного методу ММ (2100 молекул води, в межах 8 Å від поверхні комплекса). Енергію взаємодії (ВЕ) між FtsZ та куркуміном вираховували із сумарних енергій (ТЕ) складових комплеекса. Було визначено вісім сайтів зв'язування куркуміна і FtsZ. Залишки Arg152, Ile214, Ala218, Gln255, Phe312 та Asp349 FtsZ білка сприяють зв'язуванню куркуміна. Куркумін-III, завдяки водневим зв'язкам між центральними карбонільними групами куркуміна-III та Gln255 і Phe312, сильніше зв'язується з FtsZ порівняно з куркумінами I і II. Вивчали дію куркуміну у двох формах: водний розчин і у складі ліпосом. Введення гомоагрегатів $A\beta_{42}$ в гіпокамп щурів з експериментальною моделлю AD викликали хронічне нейрозапалення і гіпокампальні рівні IL-1β і IL-10 щурів були збільшені в порівнянні з контрольною групою. В неокортексі головного мозку цих щурів, також було виявлено активацію запального процесу, хоча і меншою мірою – збільшення рівнів IL-1β і IL-6. Водний розчин куркуміну у неокортексі щурів проявляв специфічне інгібування цитокінової запальної активації – нормалізувались рівні IL-1β, IL-6; рівень TNFα знижувався, концентрація IL-10 не змінювалась. У гіпокампі тварин дія куркуміну на цитокінові показники проявлялась аналогічною. Проте, концентрація жодного з цитокінів не нормалізувалась, натомість зростав рівень IL-6 і IL-10. Але за порівняння показників цитокінів гіпокампу щурів груп 3 і 4 стає зрозумілим специфічне зниження рівнів IL-1β, TNFα, IL-6 і IL-10, яке обумовлене дією куркуміну. Антицитокіновий ефект куркуміну можна пояснити його здатністю інгібувати активацію запального фактору транскрипції NFκB, пригнічуючи фосфорилювання і деградацію IκBα (інгібітору NFκB). Вплив ліпосомального куркуміну на цитокінові показники у гіпокампі тварин з інтрагіпокампальним введенням Aβ42_Human позначився суттєвим пригніченням запалення – рівень TNFα зменшився на 56 %, IL-6 – на 39 %, IL-10 – на 52 %, відповідно. Проте, концентрація жодного з цитокінів не нормалізувалась. Ефект куркуміну у складі ліпосом у неокортексі щурів з моделлю AD виявив аналогічне пригнічення цитокінової реакції: рівень TNFα зменшився на 71 %, IL-6 – на 67 % і IL-10 – на 41 %, відповідно. У гіпокампі щурів з моделью AD ліпосомальна форма куркуміну

виявила більш інтенсивне пригнічення цитокінової ланки нейрозапалення, порівняно з його водним розчином.

5.1. Взаємодія куркуміну і його похідних з β-амілоїдним пептидом: молекулярне моделювання методом *ab initio*.

Chemical Physics Letters 633 (2015) 139–145

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: *Ab initio* molecular simulations

Hiromi Ishimura[a], Ryushi Kadoya[a], Tomoya Suzuki[a], Takeru Murakawa[a], Sergiy Shulga[b], Noriyuki Kurita[a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi 441-8580, Japan
[b] Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 April 2015
In final form 19 May 2015
Available online 28 May 2015

ABSTRACT

Alzheimer's disease is caused by accumulation of amyloid-β (Aβ) peptides in a brain. To suppress the production of Aβ peptides, it is effective to inhibit the cleavage of amyloid precursor protein (APP) by secretases. However, because the secretases also play important roles to produce vital proteins for human body, inhibitors for the secretases may have side effects. To propose new agents for protecting the cleavage site of APP from the attacking of the γ-secretase, we have investigated here the specific interactions between a short APP peptide and curcumin derivatives, using protein–ligand docking as well as *ab initio* molecular simulations.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one form of dementia when decrease of memory and cognitive function occurs [1]. AD is caused by the accumulation of amyloid-β (Aβ) peptides in a brain [2]. Aβ peptides are produced by both β-secretase and γ-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) [3]. Among the produced Aβ peptide species, Aβ40 and Aβ42 have a large population. The previous experiments [4,5] have shown that the amount of Aβ42 is larger than Aβ40 in the brains of the AD patients. In addition, the molecular cohesion of Aβ42 in a brain was found to be stronger than that of Aβ40 [6]. To suppress the production of these pathogenic Aβ peptides, it is effective to inhibit the APP cleavage process by the secretases. However, the secretases also play important roles in the cleavage of other vital proteins [7,8], so that the inhibitors for the secretases may have some side effects in a body. In the previous experiments [9,10], some γ-secretase modulators (GSMs) were synthesized for inhibiting only the production of Aβ peptides, however, these GSMs were found to be effective for only mild AD patients [11]. Therefore, it has been desired to develop novel compounds which bind specifically to the cleavage site of APP and inhibit the γ-secretase attacks.

APP has 770 residues and is composed of three domains; (i) the N-terminal ectodomain (residues 18–624) locating to the extracellular space, (ii) the single hydrophobic transmembrane domain (TMD, residues 625–648) and (iii) the short intracellular domain (AICD, residues 649–695) [12]. By the two-step cleavage of APP by β- and γ-secretases, Aβ peptide species having 37–43 amino acid residues are produced [13]. The 28 residues in the peptide belong to the extracellular domain, while the other residues belong to the membrane-spanning domain [14]. Aβ42 and Aβ40 are produced from the cleavage of APP by the γ-secretase at the Ala713 and Val711 residues, respectively. The previous experiment [15] reported that the production of Aβ42 and Aβ40 peptides is prevented by binding some peptides to the cleavage site of APP by the γ-secretase.

Curcumin (curcumin I, Figure 1a) is contained in the root of *Curcumae Rhizoma*, and other curcuminoids such as demethoxycurcumin (curcumin II, Figure 1c) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III, Figure 1f) are also included in the root [16]. Commercial products of curcumin usually contain curcumin I (about 77%), curcumin II (about 17%), curcumin III (about 3%) [17], indicating that curcumin I is mainly consumed from the products. Curcumin derivatives have been extensively used as medicines having a variety of pharmaceutical benefits for such as inflammation, carcinoma, virus diseases, oxidative stress-induced apoptosis and neurodegenerative disease [18,19]. It was also elucidated that curcumin can control the functions of cytokines, enzymes, growth factor receptors and transcription factors. Actually, in the experiments for the laboratory animals with AD, Parkinson's disease or cerebral accidents, the effects of curcumin on these diseases were widely investigated [20–30]. In particular, it was found that curcumin binds directly to Aβ peptides to inhibit the aggregation of

* Corresponding author at: Toyohashi University of Technology, Department of Computer Science and Engineering, Tempaku-cho, Toyohashi 441-8580, Japan.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.023
0009-2614/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

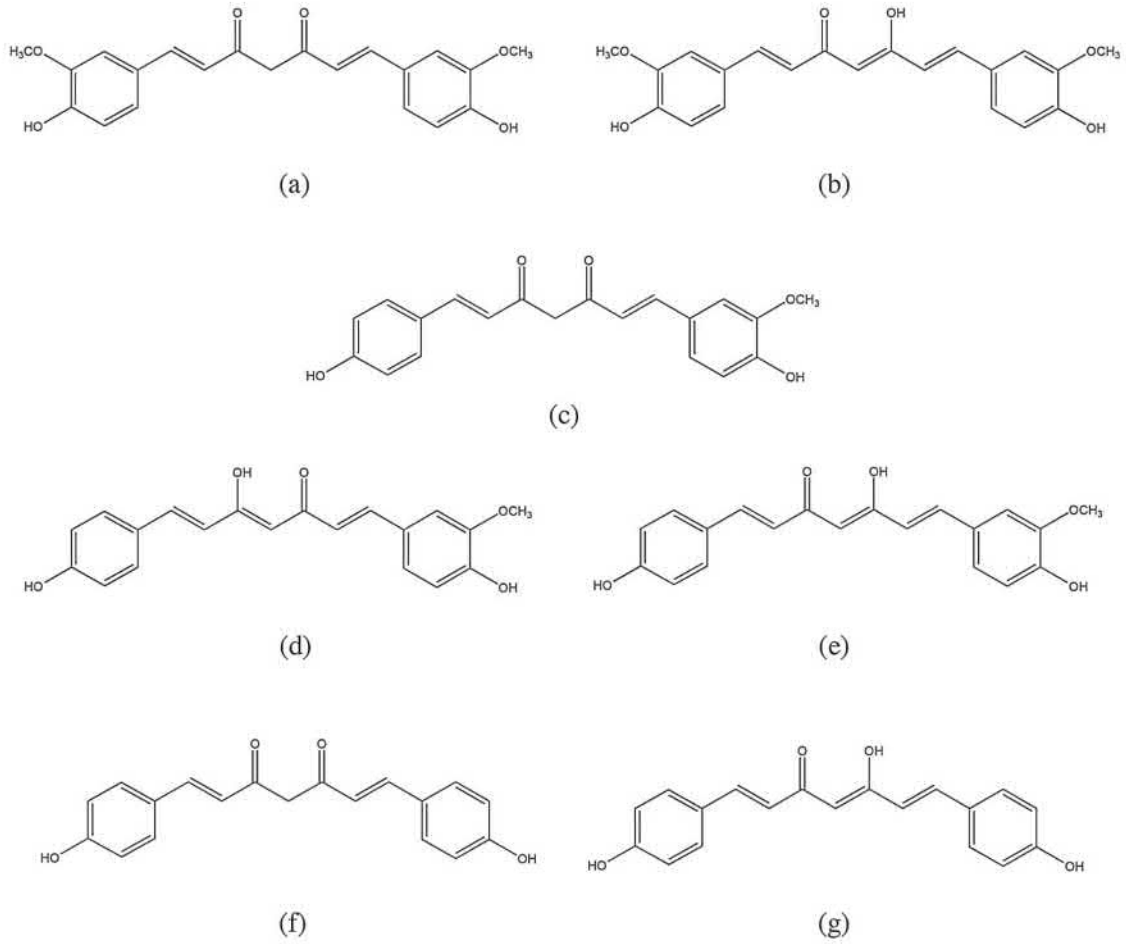


Figure 1. Chemical structure of (a) curcumin I, (b) 9-Keto 11-Enol curcumin I, (c) curcumin II, (d) 9-Enol 11-Keto curcumin II, (e) 9-Keto 11-Enol curcumin II, (f) curcumin III, (g) 9-Keto 11-Enol curcumin III.

Aβ40 and Aβ42 peptides [31], indicating the medicinal benefit of curcumin as a therapeutic agent for AD. In addition, curcumin was found to bind APP and prevent the production of Aβ peptides [32]. However, the mechanism of inhibition of these processes by curcumin has not been elucidated yet.

In the present study, we investigated the mechanism of interactions between a short APP peptide and curcumin derivatives, in order to propose new agents for suppressing the γ-secretase cleavage of APP, using protein–ligand docking as well as *ab initio* molecular simulations. Using the simulation-based results we attempted to propose some novel compounds, which can bind specifically to the APP cleavage site and inhibit the γ-secretase cleavage of APP. Our results will be useful for developing new types of medicines, which can suppress the production of Aβ peptides.

2. Details of molecular simulations

2.1. Construction of stable structures for APP + curcumin complexes

As an initial structure of APP, we used the NMR structure registered in Protein Data Bank (PDB) (PDB ID: 2LZ3 [33]). This structure is a partial structure of APP770 and composed of the 28 amino acids from the Lys699 to Lys726 residues of APP770. The cleavage site of APP770 by γ-secretase is Ala713 for producing Aβ42 and Val711 for producing Aβ40, respectively. Therefore, our employed short APP peptide includes these cleavage sites at almost the center of the peptide. In what follows, this short APP peptide is denoted by APP28. Ala713 of APP770 corresponds to Ala19 of APP28, while Val711 of APP770 corresponds to Val17 of APP28. It is noted that the numbering of residue is shifted by 694 from APP770 to APP28.

We employed here three types of curcumins (curcumin I, curcumin II, curcumin III) and their tautomers as candidate inhibitors to the APP28 cleavage. Their chemical structures are shown in Figure 1. These structures were fully optimized by the HF/6-31G(d,p) method of the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian09 [34] in vacuum as well as in water approximated by the polarizable continuum model.

To produce candidate structures and conformations of curcumin docked to APP28, we used the automated protein–ligand docking program AutoDock4.2 [35]. The structure of APP28 was fixed, while all dihedral angles of curcumin were freely rotated in order to search for a variety of stable structures and conformations

for curcumin. The size of the grid box for docking was set as 47.25 Å × 47.25 Å × 47.25 Å, and the center of the box was set on the Cα atom of Ala19 of APP28, in order to obtain the structure of curcumin docked to the cleavage site of APP28 by γ-secretase. 200 candidate structures were created for each complex by use of the genetic algorithm of AutoDock4.2, and they were classified into several clusters according to the value (1 Å) of the root mean square deviation (RMSD) between each of the structures created. In docking simulations, we assigned the charge of each atom of curcumin evaluated by the restrained electrostatic potential (RESP) [36] analysis based on HF/6-31G(d) of Gaussian09. In the present simulations, we considered only a partial structure of APP770 protein, and the N- and C-terminal parts of APP28 are not comparable to those in APP770. Therefore, the structures of curcumin docked around the terminal parts of APP28 were excluded actually from the candidate structures for the APP28 + curcumin complex.

Next, the candidate structures of the complexes were fully optimized in water by the classical molecular mechanics (MM) method. To consider the solvation effect on the complex properly, we added water molecules with a 8 Å layer around the complex and optimized the solvated structure by using classical MM calculation program AMBER12 [37], in which AMBER99SB-ILDN [38], general AMBER (GAFF) [39] and TIP3P [40] force fields were assigned for APP28, curcumin and the water molecules, respectively. The RESP charges of each atom in curcumin evaluated by HF/6-31G(d) were assigned in the GAFF force field of curcumin. The threshold value of the energy-gradient for the convergence in the optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å. The N- and C-terminus of APP28 are terminated by the acetyl and the methylamine group, respectively.

2.2. FMO calculations for APP + curcumin complexes

To determine the most stable structure of the complex among the candidate ones, we carried out *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations [41,42] for all candidate structures, using the *ab initio* FMO program ABINIT-MP6.0 [42]. From the comparison of total energies (TE) evaluated by FMO, the most stable structure of the APP28 + curcumin complex was determined accurately. In the FMO calculations, we considered the water molecules existing within a 5 Å distance from curcumin explicitly, and *ab initio* second-order Møller–Plesset (MP2) method [43,44] was used to investigate accurately the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between each of APP28 residues and curcumin. The 6-31G basis-set was used. Each of the APP28 residues, curcumin and each water molecule were assigned as a fragment, because this fragmentation enables us to evaluate the interaction energies between the residues, curcumin and solvating water molecules.

In order to predict binding affinity of curcumin to APP28, we evaluated the binding energy (BE) between APP28 and curcumin, considering water molecules explicitly in the *ab initio* FMO calculations. The BE is estimated from the following equation.

$$\mathrm{BE} = -\mathrm{TE}\ (\mathrm{APP} + \mathrm{curcumin} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}\ (\mathrm{APP} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}\ (\mathrm{curcumin} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}\ (\mathrm{water}).$$

In addition, to elucidate the specific interactions between APP28 and curcumin, we analyzed the inter fragment interaction energies (IFIE) [45] obtained by the FMO calculations. From this analysis, the important residues in APP28 and the important parts of curcumin were highlighted at an electronic level for the binding between them.

3. Results and discussion

3.1. Stable structures of curcumins and their complexes with APP28

We first optimized structures of curcumin I, curcumin II, curcumin III by use of *ab initio* HF/6-31G(d,p) method of Gaussian09. Because these curcumins have tautomeric forms, we also constructed the tautomeric forms and optimized them by the same method. The optimized structures in vacuum and in water are shown in Figures S1 and S2 of supporting information, respectively. Their total energies are compared in Table S1, indicating that the tautomeric keto-enol form is less stable than the original diketo form for all types of curcumin derivatives. This result is comparable to that obtained by Manolova et al. [46]. In water, two keto groups of the original curcumin are expected to form hydrogen bonds with water molecules to be more stable in their hydrated structures. In the following analysis, we thus employed the original form of curcumins as the ligands docked to APP28.

By use of AutoDock4.2 [35], we created 200 candidate structures for each APP28 + curcumin complex, and they were classified into 57 (curcumin I), 127 (curcumin II) and 86 (curcumin III) clusters, respectively. Among these clusters, we selected only realistic structures, in which curcumin is docked to the parts other than the N- and C-terminal ones. The number of the selected structures is 38 (curcumin I), 79 (curcumin II) and 56 (curcumin III), respectively. Subsequently, we added solvating water molecules around the selected structures and optimized the solvated structures by classical MM method. The optimized structures were compared in Figure 2. As shown in Figure 2a and c, curcumins I and III prefer to bind to the N- or C-terminal side of APP28 rather than the central part. In contrast, Figure 2b indicates that curcumin II prefers to bind to the central part of APP28. This difference in binding position of curcumin II is likely to come from the low-symmetry of curcumin II.

3.2. Specific interactions between APP28 and curcumin

To determine the most stable structure for each APP28 + curcumin complex accurately, we evaluated total energies of all structures optimized by classical MM method, using *ab initio* MP2/6-31G method of ABINIT-MP6.0 [42]. In the FMO calculations, we considered explicitly the water molecules existing within 5 Å distance from curcumin, because the water molecules existing around the cleavage site of APP peptide contribute to the hydrolysis reaction of APP peptide induced by γ-secretase.

The distribution of total energies evaluated is shown in Figure 3. As for APP28 + curcumin I complex (Figure 3a), the 195th structure is the most stable, while the 72nd one is only 5.6 kcal/mol less stable than the 195th one. The other structures are at least 100 kcal/mol less stable than the 195th one. Therefore, we determined the 195th and the 72nd structures as the most stable one for APP28 + curcumin I complex. As for APP28 + curcumin II complex (Figure 3b), because the 161st structure is the most stable and at least 100 kcal/mol more stable than the other structures, this structure was employed as the most stable one for APP28 + curcumin II complex. As shown in Figure 3c, the 156th structure is the most stable for APP28 + curcumin III complex. There are some structures in the energy range of 100 kcal/mol, however, the next stable structure is 35.3 kcal/mol less stable. Accordingly, we employed the 156th structure in the following analysis. It should be noted that the classical MM method leads to the different distribution of total energies, compared with the *ab initio* FMO results. In fact, as shown in Figure 4a, the 195th and the 72nd structures of APP28 + curcumin I are not the most stable one in the classical MM calculations, and they are at least 55 kcal/mol less stable than the

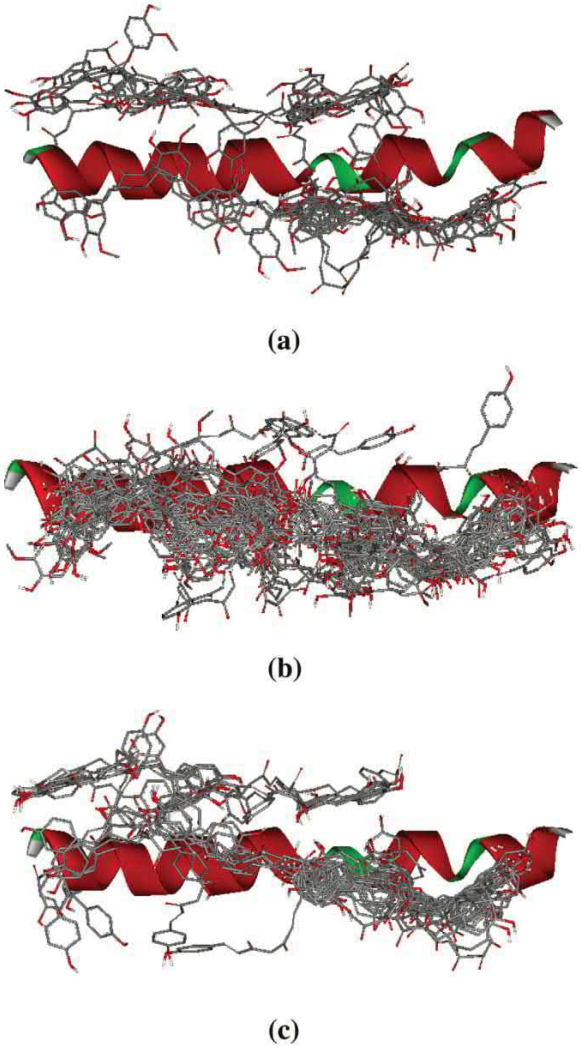


Figure 2. Conformations and positions of (a) curcumin I, (b) curcumin II, (c) curcumin III docked to APP28.

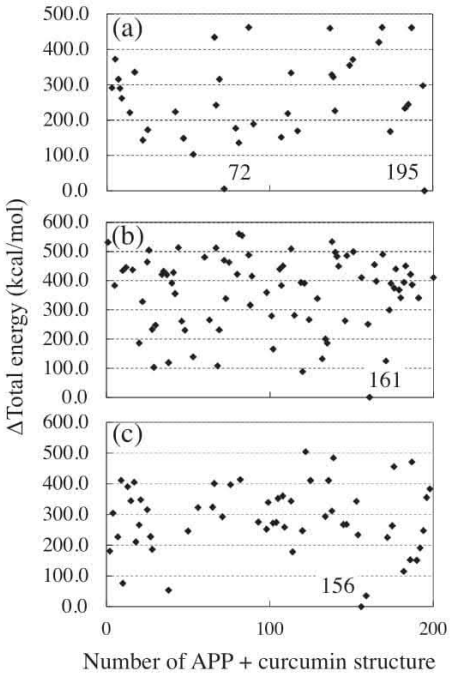


Figure 3. Distributions of total energies of APP28 + curcumin complexes evaluated by MP2/6-31G method of FMO; (a) curcumin I, (b) curcumin II and (c) curcumin III.

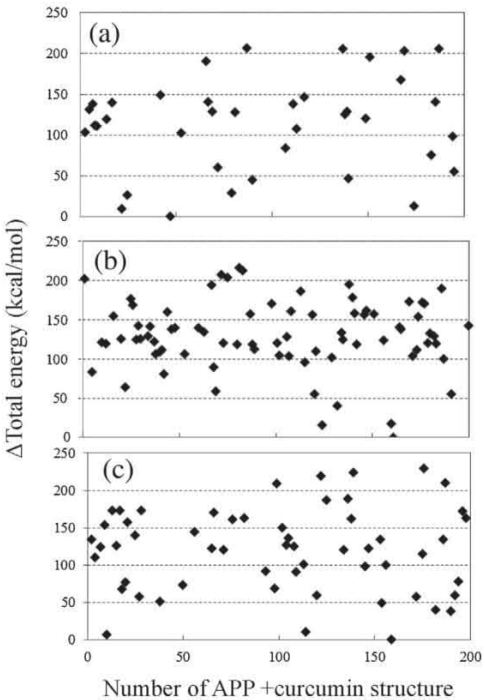


Figure 4. Distributions of total energies of APP28 + curcumin complexes evaluated by classical MM method of AMBER12 [37]; (a) curcumin I, (b) curcumin II and (c) curcumin III.

most stable 47th structure. The similar differences were obtained for APP28 + curcumin II and APP28 + curcumin III, as shown in Figure 4b and c. Therefore, it is elucidated that the classical MM method is not accurate enough for evaluating the relative stability among the different structures of APP28 + curcumin complex.

To elucidate the binding affinity between APP288 and curcumins, we investigated the binding energy (BE) between them by use of the *ab initio* FMO method. The total energies of the component structures of the complex and the estimated BEs for the three complexes are listed in Table 1. The 195th structure of APP28 + curcumin I has the largest BE, which is at least 86 kcal/mol larger than those for the other complexes. It is thus expected that curcumin I can bind more strongly to APP28 than curcumin II and curcumin III. To make clear the reason why curcumin I binds strongly to APP28, the interaction energies (IEs) between each amino acid residue of APP28 and curcumin I, II and III were investigated by the IFIE analysis [45] of ABINIT-MP6.0 [42]. The results are compared in Figure 5.

Figure 5a indicates that in the 72nd structure of APP28 + curcumin I complex, curcumin I interacts mainly with Lys30, although the IE is not so large (-15 kcal/mol). In fact, as

Table 1
Total energies (kcal/mol) of each component of the APP + curcumin complex, and estimated binding energy (BE) (kcal/mol) between APP and curcumin.

Total energy					BE
Curcumin	APP + Ligand + Water	APP + Water	Ligand + Water	Water	
Curcumin I_72	−12,151,655.6	−11,362,140.6	−5,710,130.8	−4,920,637.5	21.6
Curcumin I_195	−12,151,661.2	−11,362,040.7	−5,710,168.1	−4,920,674.5	126.9
Curcumin II_161	−11,315,722.7	−10,597,758.8	−4,874,075.5	−4,156,152.0	40.3
Curcumin III_156	−12,008,482.0	−11,362,098.8	−5,566,945.2	−4,920,576.2	14.3

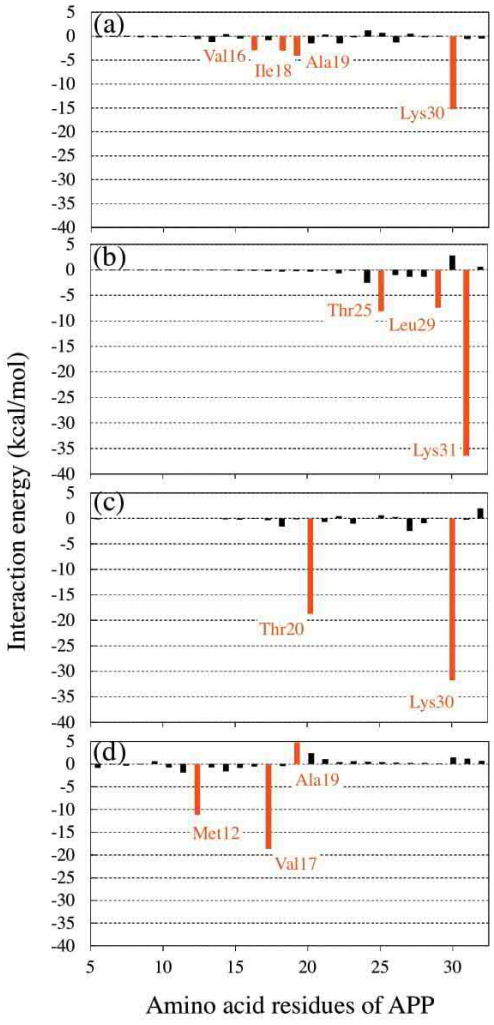


Figure 5. Interaction energies between each amino acid residue of APP28 and curcumin evaluated by MP2/6-31G method of FMO; (a) curcumin I_72, (b) curcumin I_195, (c) curcumin II and (d) curcumin III.

shown in Figure 6a, the hydroxyl group of curcumin I has a hydrogen bond with the Lys30 side chain, and the oxygen atoms of curcumin I interact electrostatically with the side chains of Val16, Ile18 and Ala19 of APP28. By these interactions, curcumin I binds weakly to APP28 in a way as it covers over the γ-secretase cleavage sites (Val17 and Ala19) of APP28. It is thus expected that curcumin I can prevent the γ-secretase attacking to the cleavage site of APP, if curcumin I is tightly bound to APP28 in this conformation.

On the other hand, in the 195th structure of APP28 + curcumin I complex, which is slightly more stable than the 72nd one, curcumin I interacts strongly with Lys31 of APP28, and additionally it interacts attractively with Thr25 and Leu29 of APP28, as shown in Figure 5b. The central carbonyl group of curcumin I forms a hydrogen bond and electrostatic interaction with the side chain of Lys31 to produce strong attractive interaction between curcumin I and Lys31, as indicated in Figure 6b. In addition, hydrogen atoms of curcumin I interacts with the carbonyl group of backbone of Thr25 and Leu29 by the electrostatic interactions. In the structure shown in Figure 6b, the Ala19 position is not covered by curcumin I, although curcumin I binds strongly with APP28. Therefore, it is not expected that curcumin I can inhibit the attacking of γ-secretase effectively in this binding conformation.

The interaction energies between each of APP28 residues and curcumin II are shown in Figure 5c. Curcumin II interacts strongly with Lys30 and Thr20. These interactions are stronger than those in the APP28 + curcumin I complex. As shown in Figure 6c, the side chain of Lys30 has a hydrogen bond with the central carbonyl group of curcumin II and additionally interacts with the oxygen atom of the O-methyl group of curcumin II. In addition, the side chain of Thr20 is hydrogen bonded with the hydroxyl group of curcumin II. These two residues of APP28 contribute mainly to the binding of curcumin II, although the Ala19 site is not covered by the curcumin II binding at all. Therefore, it is elucidated that curcumin II binds specifically to Lys30, which stays away from the Ala19 position, so that it may be difficult for curcumin II to cover the Ala19 position.

As shown in Figure 5d, the interactions between APP28 and curcumin III are not so strong. Curcumin III interacts attractively with Val17 and Met12, while it interacts repulsively with Ala19. To make clear the reason for these interactions, we analyzed the structure around curcumin III. Figure 6d indicates that Met12 and curcumin III interact by electrostatic as well as and CH-π interactions. In addition, by the hydrogen bond between the carbonyl group of Val17 backbone and the hydroxyl group of curcumin III, the hydroxyl group comes closer to the side chain of Ala19. As a result, repulsive interaction between Ala19 and curcumin III is caused in the complex. It is noted that curcumin III binds strongly with the Val17 backbone, indicating the possibility that curcumin III can inhibit the Aβ40 production by γ-secretase, because the Val17 is the cleavage site by γ-secretase for producing Aβ40.

Finally, to make clear the difference in binding positions of the three curcumins on APP28, we summarized their positions in Table S2 of supporting information. As for the APP28 + curcumin I complex, there are two stable structures. In the 72nd structure, curcumin I interacts weakly with many residues of APP28, resulting in a wide covering of APP28 by curcumin I. In addition, the positions of Ala19 as well as Val17 are covered by curcumin I. Therefore, it is expected that curcumin I can inhibit the production of Aβ42 and Aβ40 effectively. On the other hand, in the 195th structure of the APP28 + curcumin I complex, it is not possible to cover the Ala19 position by curcumin I, due to the strong interaction between curcumin I and Lys31 located far from Ala19. Curcumin II binds strongly with Lay30 in a similar way as in the 195th structure of APP28 + curcumin I. As a result, curcumin II cannot cover the Ala19 position. In contrast, because curcumin III has no O-Me group, it prefers to interact with non-charged and hydrophobic residues of APP28 in comparison with curcumin I and II. In fact, as listed in

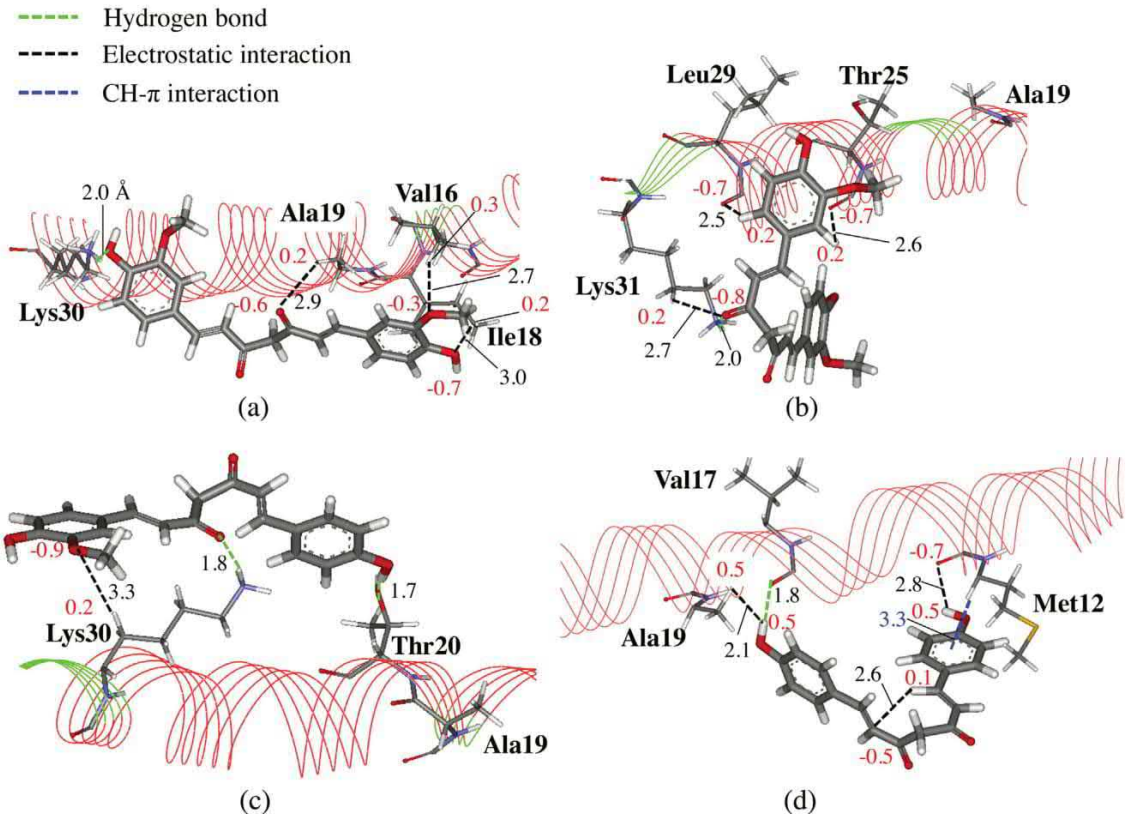


Figure 6. Interacting structures between APP28 residues and curcumin; (a) curcumin I_72, (b) curcumin I_195, (c) curcumin II and (d) curcumin III. Distances (Å) between atoms are indicated in black or blue, while charges of atoms are indicated in red. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

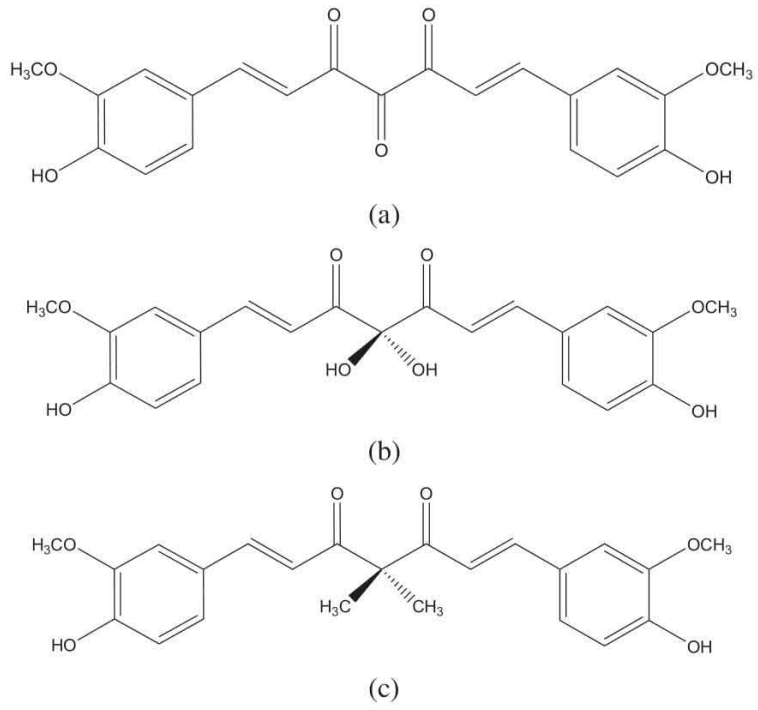


Figure 7. Structural formulae of novel ligands proposed in the present study; (a) curcumin IV, (b) curcumin V and (c) curcumin VI.

Table S2, curcumin III binds to the position from Met12 to Val17, which is composed mainly with the hydrophobic residues and contains Val17 of the cleavage site by γ-secretase.

From the above analysis of the specific interactions between APP28 and the three types of curcumins, it is expected that some modifications of curcumin I, which enhances the binding between APP28 and curcumin I in the 72nd structure, can produce potent inhibitors to cover the Ala19 and Val17 positions of APP28. Figure 6a indicates that two phenyl groups of curcumin I are important for keeping this conformation and that Ala19 of APP28 exists near the central part of curcumin I. It is thus expected that if the interaction between the central part and APP28 could be enhanced by adding some groups to the central part, the modified curcumin I may be an efficient inhibitor to cover the Ala19 site from the attack of γ-secretase.

Based on the above idea, we proposed the novel curcumins shown in Figure 7. As indicated in Figure 7a, we introduced an oxygen atom into the central part of curcumin I additionally, which is expected to interact with the positively charged parts of APP28 and enhance the binding affinity with APP28. In the curcumin V (Figure 7b), two hydroxyl groups were introduced into the central part of curcumin I. They are expected to exist near the residues around Ala19 and enhance the electrostatic interactions with APP28. On the other hand, we introduced two methyl groups into the central part to propose the curcumin VI, as shown in Figure 7c. The methyl groups are expected to enhance the hydrophobic interactions between curcumin and the hydrophobic residues of APP28. The *ab initio* molecular simulations for our proposed curcumins are underway now to reveal their potentiality as a potent inhibitor to the attack of γ-secretase to APP28.

4. Conclusions

By use of *ab initio* molecular simulations, we searched the stable structures of APP + curcumin complexes in water and found that curcumin I binds to APP in a way as it covers over the γ-secretase cleavage site of APP, although the binding affinity between curcumin I and APP is not so strong. It is thus expected that curcumin I can suppress the cleavage of APP by γ-secretase, if the interactions between curcumin I and APP are enhanced by introducing some groups into curcumin I. For this purpose, we investigated the specific interactions between curcumin I and APP to find that the interactions can be enhanced by introducing some groups into the central part of curcumin I. Consequently, we proposed some novel curcumins shown in Figure 7 as an inhibitor to the attack of γ-secretase to APP.

Acknowledgements

This study is supported by the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of National Academy of Science of Ukraine.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cplett.2015.05.023

References

[1] R.N. Kalaria, G.E. Maestre, R. Arizaga, R.P. Friedland, D. Galasko, K. Hall, J.A. Luchsinger, A. Ogunniyi, E.K. Perry, F. Potocnik, M. Prince, R. Stewart, A. Wimo, Z.X. Zhang, P. Antuono, Lancet Neurol. 7 (2008) 812.
[2] J.T. Jarrett, E.P. Berger, P.T. Lansbury Jr., Biochemistry 32 (1993) 4693.
[3] D.J. Selkoe, Physiol. Rev. 81 (2001) 741.
[4] M. Rak, M.R.D. Bigio, S. Mai, D. Westaway, K. Gough, Biopolymers 87 (2007) 207.
[5] S.A. Gravina, L. Ho, C.B. Eckman, K.E. Long, L. Otvos Jr., L.H. Younkin, N. Suzuki, S.G. Younkin, J. Biol. Chem. 270 (1995) 7013.
[6] A.E. Roher, J.D. Lowenson, S. Clarke, A.S. Woods, R.J. Cotter, E. Gowing, M.J. Ball, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (1993) 10836.
[7] G. Struhl, I. Greenwald, Nature 398 (1999) 522.
[8] A.J. Beel, C.R. Sanders, Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 1311.
[9] S. Weggen, J.L. Erikson, P. Das, S.A. Sagi, R. Wang, C.U. Pietrzik, K.A. Findlay, T.E. Smith, M.P. Murphy, T. Bulter, D.E. Kang, N. Marquez-Sterling, T.E. Golde, E.H. Koo, Nature 414 (2001) 212.
[10] T. Kukar, M.P. Murphy, J.L. Erikson, S.A. Sagi, S. Weggen, T.E. Smith, T. Ladd, M.A. Khan, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V.V. Ozols, P.Z. Anastasiadis, P. Das, A. Fauq, E.H. Koo, T.E. Golde, Nat. Med. 11 (2005) 545.
[11] N. Kakuda, K. Akazawa, H. Hatsuta, S. Murayama, Y. Ihara, Neurobiol. Aging 4 (2013) 1101.
[12] U. Müller, K. Wild, in: I. Zerr (Ed.), Understanding Alzheimer's Disease, InTech, 2013 (Chapter 1).
[13] W. Anneaert, B. De Strooper, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18 (2002) 25.
[14] S.S. Sisodia, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 6075.
[15] S. Funamoto, T. Sasaki, S. Ishihara, M. Nobuhara, M. Nakano, M. Watanabe-Takahashi, T. Saito, N. Kakudam, T. Miyasaka, K. Nishikawa, T.C. Saudo, Y. Ihara, Nat. Commun. 4 (2013) 2529.
[16] K.R. Srinvasan, Curr. Sci. 21 (1952) 311.
[17] F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda, Chem. Pharm. Bull. 41 (1993) 1640.
[18] B.B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa, Adv. Exp. Med. Biol. 595 (2007) 1.
[19] B. Ray, D.K. Lahiri, Curr. Opin. Pharmacol. 9 (2004) 434.
[20] U.R. Pendurthi, J.T. Williams, L.V.M. Rao, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (1997) 3406.
[21] S.A. Frautschy, W. Hu, P. Kim, S.A. Miller, T. Chu, M.E. Harris-White, G.M. Cole, Neurobiol. Aging 22 (2001) 993.
[22] G.P. Lim, T. Chu, F. Yang, W. Beech, S.A. Frautscy, G.M. Cole, J. Neurosci. 21 (2001) 8370.
[23] E.K. Ryu, Y.S. Choe, K. Lee, Y. Choi, B. Kim, J. Med. Chem. 49 (2006) 6111.
[24] K. Yazawa, T. Kihara, H. Shen, Y. Shimmyo, T. Niidome, H. Sugimoto, FEBS Lett. 580 (2006) 6623.
[25] G.M. Cole, B. Teter, S.A. Frautschy, Adv. Exp. Med. Biol. 595 (2007) 197.
[26] M. Garcia-Alloza, L.A. Borrelli, A. Rozkalne, B.T. Hyman, B.J. Bacskai, J. Neurochem. 102 (2007) 1095.
[27] H.W. Suh, S. Kang, K.S. Kwon, Mol. Cell. Biochem. 298 (2007) 187.
[28] Y. Sumanont, Y. Murakami, M. Tohda, O. Vajragupta, H. Watanabe, K. Matsumoto, Biol. Pharm. Bull. 30 (2007) 1732.
[29] Y.F. He, H.J. Chen, L.H. Qian, G.Y. Chen, Brain Res. 1339 (2010) 60.
[30] H.M. Wang, Y.X. Zhao, S. Zhang, G.D. Liu, W.Y. Kang, H.D. Tang, J.Q. Ding, S.D. Chen, J. Alzheimers Dis. 20 (2010) 1189.
[31] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P.P. Chen, R. Kayed, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, J. Biol. Chem. 280 (2005) 5892.
[32] C. Zhang, A. Browne, D. Child, R.E. Tanzi, J. Biol. Chem. 285 (2010) 28472.
[33] W. Chen, E. Gamache, D.J. Rosenman, J. Xie, M.M. Lopez, Y.M. Li, C. Wang, Nat. Commun. 5 (2014) 53037.
[34] M.J. Frisch, et al., Gaussian09, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.
[35] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstorm, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, J. Comput. Chem. 16 (2009) 2785.
[36] B.H. Besler, K.M. Merz Jr., P.K. Kollman, J. Comput. Chem. 11 (1990) 431.
[37] D.A. Case, et al., AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
[38] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926.
[39] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157.
[40] L.J. William, C. Jayaraman, D.M. Jeffry, W.I. Roger, L.K. Michael, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926.
[41] D.G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 7562.
[42] S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 10310.
[43] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442.
[44] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473.
[45] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, S. Tanaka, J. Comput. Chem. 27 (2006) 948.
[46] Y. Manolova, V. Deneva, L. Antonov, E. Drakalska, D. Momekova, N. Lambov, Mol. Biomol. Spectrosc. 132 (2014) 815.

Ab initio molecular simulations on specific interactions between amyloid-β peptide and new curcumin derivatives

Shintaro Ota, Hiromi Ishimura,
*Mitsuki Fujimori, and Noriyuki Kurita**
Department of Computer Science and Engineering
Toyohashi University of Technology
Toyohashi, 441-8580, Japan
** E-mail: kurita@cs.tut.ac.jp*

Sergiy Shulga
Institute for Food Biotechnology and Genomics
National Academy of Sciences of Ukraine
2a. Osypovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine
E-mail: Shulga5@i.ua

***Abstract*—Accumulation of amyloid-β (Aβ) peptides in a brain is closely related with the pathogenesis of Alzheimer's disease. To suppress the production of Aβ peptides, many kinds of agents have been developed for inhibiting the cleavage of amyloid precursor protein (APP) by secretases. However, because the secretases also play important roles the production of vital proteins for the human body, inhibitors for the secretases may have side effects. In the present study, to propose new agents for protecting the cleavage site of APP from the attacking of the γ-secretase, we investigate the specific interactions between a short APP peptide and curcumin derivatives, using protein-ligand docking as well as *ab initio* molecular simulations. Our proposed derivatives (curcumin VI and IX) are found to have a large binding energy with APP, and they are expected to be a potent inhibitor to the production of Aβ peptides.**

Keywords— Amyloid precursor protein; Alzheimer's disease; inhibitor; fragment molecular orbital; protein and ligand docking;

I. INTRODUCTION

The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is recognized to be related with the accumulation of amyloid-β (Aβ) peptides in a brain [1]. Aβ peptide species having a variety of lengths (from 37 to 43 residues) are produced by both the β-secretase and γ-secretase cleavages of amyloid precursor protein (APP), which is composed of 770 amino acid residues [2]. Among the produced species, Aβ40 and Aβ42 have a large population, and the amount of Aβ42 is larger than Aβ40 in the brains of AD patients. In order to suppress the production of these pathogenic Aβ peptides, it is effective to inhibit the APP cleavage process by the secretases. However, since the secretases also play important roles in the cleavage of other vital proteins [3, 4], the inhibitors for the secretases may have some side effects. In previous experiments [5, 6], some γ-secretase modulators (GSMs) were synthesized for inhibiting only the production of Aβ peptides, however, these GSMs were found to be effective only for patients with mild AD [7]. Therefore, it is necessary to develop novel compounds which bind specifically to the cleavage site of APP and inhibit the γ-secretase attacks to APP [8].

As candidate compounds for the inhibitor, we employed the curcumin derivatives, because they have been used as traditional medicines for treating many diseases such as inflammation, carcinoma, virus diseases, oxidative stress-induced apoptosis and neurodegenerative disease [9, 10]. Curcumin (curcumin I, Figure 1a) is contained in the root of *Curcumae Rhizoma,* and other curcuminoids such as demethoxycurcumin (curcumin II) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III) are also included in the root [11]. Commercial products of curcumin usually contain curcumin I (about 77 %), curcumin II (about 17 %), curcumin III (about 3 %)[12], indicaing that curcumin I is mainly consumed from the products. It was found that curcumin binds directly to Aβ peptides to inhibit the aggregation of Aβ40 and Aβ42 peptides [13], indicating the medicinal benefit of curcumin as a therapeutic agent for AD. In addition, curcumin was found to bind APP and prevent the production of Aβ peptides [14]. However, the mechanism of inhibition of these processes by curcumin has not been elucidated yet.

In a previous study [15], we investigated the mechanism of interactions between a short APP peptide and curcumin derivatives, to propose new agents for suppressing the γ-secretase cleavage of APP, using protein-ligand docking as well as *ab initio* molecular simulations. Based on the results simulated, we proposed three types of novel compounds, which can bind specifically to the APP cleavage site and inhibit the γ-secretase cleavage of APP. In the present study, we first investigated the binding properties between APP and the proposed curcumin derivatives in the same way as the previous study [15]. Moreover, new agents were proposed as a candidate inhibitor for suppressing the γ-secretase cleavage of APP, and their binding properties to APP were investigated to reveal their efficiency as an inhibitor.

II. DETAILS OF MOLECULAR SIMULATIONS

A. Construction of stable structures for APP+curcumin complexes

We first optimized the structures of new curcumin derivatives (curcumin IV, curcumin V, curcumin VI) proposed in our previous study [15], using the HF/6-31G(d,p) method of

978-1-5090-1636-5/16/$31.00 ©2016 IEEE

the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian09 (G09) [16] in water approximated by the polarizable continuum model of G09. Their chemical structural formulas are shown in Figure 1.

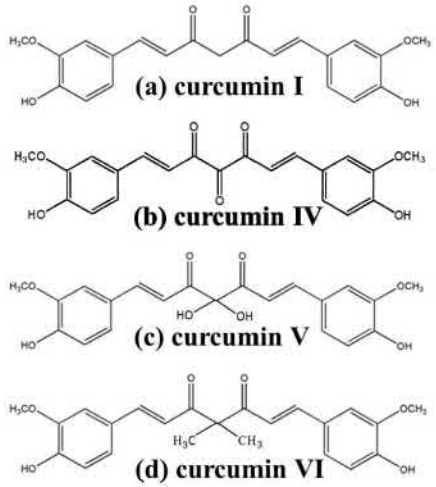


Figure 1 Chemical structures of (a) curcumin I, (b) curcumin IV, (c) curcumin V and (d) curcumin VI.

As the initial structure of APP, the NMR structure registered in Protein Data Bank (PDB) (PDB ID: 2LZ3 [17]) was used. This structure is composed of the 28 amino acids from the Lys699 to Lys726 residues of APP770, including the cleavage site by γ-secretase. In what follows, this short APP peptide is denoted by APP. The cleavage site (Ala713) for producing Aβ42 corresponds to Ala19 of APP, while Val711 for Aβ40 corresponds to Val17 of APP.

The creation of the candidate structures and conformations of curcumin docked to APP was performed using the automated protein-ligand docking program AutoDock4.2 [18], in the same way as the previous study [15]. The size of the grid box for docking was set as 47.25×47.25×47.25 Å^3, and the center of the grid box was set on the Cα atom of the Ala19 of APP. For each APP+curcumin complex, 200 candidate structures were created by use of the genetic algorithm of AutoDock4.2, and they were classified into several clusters according to the value (1 Å) of the root mean square deviation (RMSD) between each of the structures created. It is noted that we here assigned the charge of each atom of curcumin evaluated by the restrained electrostatic potential (RESP) analysis [19] based on HF/6-31G(d) of G09, because the RESP charge more accurately represents the charge distribution of a molecule.

The candidate structures of the complexes were fully optimized in water by the classical molecular mechanics (MM) calculation program AMBER12 [20]. To consider the solvation effect on the complex properly, we added water molecules with an 8 Å layer around the complex. In the MM optimizations, AMBER99SB-ILDN force field [21] for APP, TIP3P force field [22] for water molecules, and GAFF (General Amber force field) [23] for curcumin were used. The threshold value of the energy-gradient for the convergence in the optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å. The N- and C-terminus of APP were terminated by the acetyl and the methylamine group, respectively.

B. FMO calculations for APP+curcumin complexes

From the candidate structures of the APP+curcumin complex obtained by the docking and MM optimizations, we selected the five best structures based on the docking score of AutoDock4.2. In addition, their total energies (TEs) were calculated accurately using the *ab initio* FMO [24] calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [25], and the most stable structure of the complex was determined from the comparison of the TEs evaluated.

In the present FMO calculations, we considered the water molecules existing within a 5 Å distance from curcumin explicitly. The number of water molecules is 57 for all complexes. The *ab initio* second-order Møller-Plesset (MP2) method [26, 27] of ABINIT-MP Ver.6.0 [25] was used to accurately investigate the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between each of APP residues and curcumin. The 6-31G basis-set was used. Each of the APP residues, curcumin and each water molecule were assigned as a fragment, because this fragmentation enables us to evaluate the interaction energies between the residues, curcumin and solvating water molecules.

To predict the binding affinity of curcumin to APP, we evaluated the binding energy (BE) between APP and curcumin, considering water molecules explicitly. The BE is estimated from the following equation.

BE=−TE(APP+curcumin+water)+TE(APP+water)+TE(curcumin+water)−TE(water).

In addition, to elucidate the specific interactions between APP and curcumin, we analyzed the inter fragment interaction energies (IE)[28] obtained by the FMO calculations. From this analysis, the important residues in APP and the important parts of curcumin were highlighted at an electronic level for the binding between them. Based on the IEs evaluated by the FMO calculations and the interacting structures around the curcumin derivatives in the complexes, we attempted to propose new curcumin derivatives with a larger binding affinity to APP.

III. Results and Discussion

A. Binding properties between APP and previously proposed curcumins

By the use of AutoDock4.2 [18], we created 200 candidate structures for each APP+curcumin complex, and they were classified into 110 (curcumin IV), 182 (curcumin V) and 158 (curcumin VI) clusters, respectively. Among these clusters, we selected the best five ones from the viewpoint of the docked score evaluated by AutoDock4.2. Subsequently, we added solvating water molecules around the selected structures and optimized the solvated structures by the classical MM method. In the optimizations for the APP+curcumin V complex, the H atom of the hydroxyl group and the oxygen atom of curcumin

V were bonded during the optimization, resulting in the optimized structure not being obtained for the three structures. For the optimized structures, TEs were evaluated by the FMO calculations, which explicitly consider the solvating water molecules around the complex. Therefore, in what follows, we considered only the most stable structure and investigated its binding properties between APP and curcumin for all complexes.

To predict the binding affinity between APP and curcumins, we investigated the BE between them by use of the *ab initio* FMO method. The total energies of the component structures of the complex and the estimated BEs are listed in Table 1. The BEs for the curcumins IV, V and VI are significantly different from each other, and curcumin VI has the largest BE. In curcumin V, two hydroxyl groups are introduced at the center of curcumin I. The O and H atoms of the groups are easily bonded to each other during the structural optimization. This bonding is likely to be related with the rather smaller BE for the curcumin V. In curcumin IV, the central O atom introduced to curcumin I interacts with the solvating water molecules. As a result, this O atom has no direct interaction with APP, leading to the smaller BE. In contrast, curcumin VI has two hydrophobic methyl groups at the center, so that these groups are pushed out to the APP side by the solvating water molecules, resulting in the large BE between APP and curcumin VI.

Table 1 Total energies (TE, kcal/mol) and binding energies (BE, kcal/mol) between APP and curcumin calculated by MP2/6-31G of ABINIT MP 6.0.

Ligand	TE				BE
	APP+ligand+water	APP+water	Ligand+water	Water	
curcumin I	-12151655.6	-11362140.6	-5710130.8	-4920637.5	21.6
curcumin IV	-10000088.5	-9164296.4	-3558612.6	-2722849.1	28.5
curcumin V	-10477798.0	-9594187.4	-4036491.4	-3152900.7	19.9
curcumin VI	-10146143.6	-9307529.6	-3704746.2	-2866168.1	35.9

To make clear the reason why curcumin VI binds strongly to APP, the interaction energies (IEs) between each amino acid residue of APP and curcumin IV, V and VI were investigated by the IFIE analysis [28] of ABINIT-MP6.0 [25]. The results are compared in Figure 2.

As shown in Figure 2c, curcumin VI interacts strongly with Ile9 and Met12. In particular, the interaction with Met12 is stronger than those for curcumin IV and V, and curcumin VI has attractive interactions with the APP residues around Ala19. The interacting structure between APP and curcumin VI is shown in Figure 3c, indicating that the hydroxyl groups at both ends of curcumin VI interact strongly with Ile9 and weakly with Ala19. In addition, curcumin VI interacts with Met12, Leu11 and Val16 by CH-π interaction. Because Ala19 is a cleavage site by γ-secretase for producing pathogenic Aβ42, curcumin VI is expected to be a potent inhibitor which covers the Ala19 site with a large binding affinity.

Figure 2a shows the interaction energy between each APP residue and curcumin IV. Curcumin IV interacts strongly with Ile9, Met12 and Val16, although the interaction with Met12 is weaker than that for curcumin VI. The difference in this interaction is the main reason for the smaller BE of curcumin IV compared with that of curcumin VI as listed in Table 1. As shown in Figure 3a, the interacting sites between APP and curcumin IV are similar to those for curcumin VI. However, the distances between the APP residues and curcumin IV are a little longer than those between APP and curcumin VI, as indicated in Figures 3a and 3c. Curcumin IV can cover the Ala19 site of APP to be a potent inhibitor against Aβ42 production.

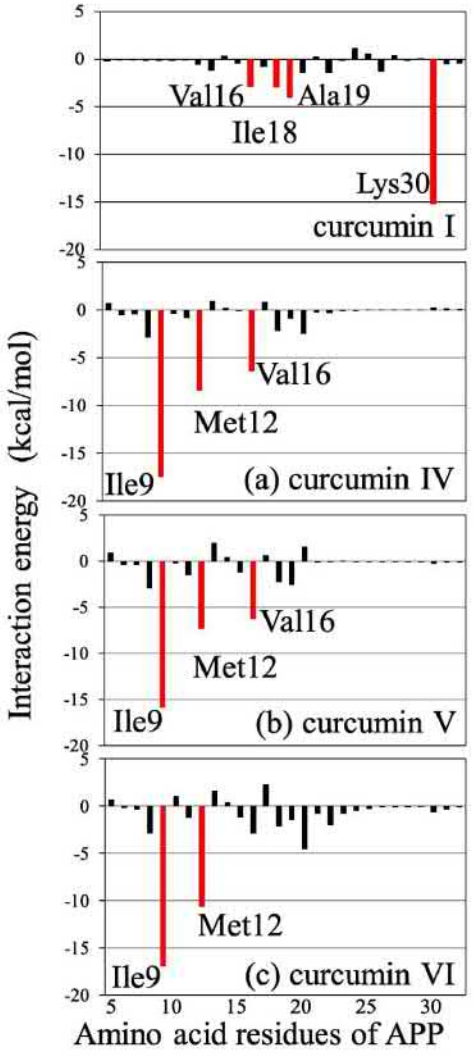


Figure 2 Interaction energies between amino acid residues of APP and (a) curcumin IV, (b) curcumin V, and (c) curcumin VI evaluated by MP2/6-31G method of FMO.

As listed in Table 1, curcumin V has smaller BE compared with the other curcumins. Its interaction energies with the APP residues are shown in Figure 2b. Although curcumin V interacts strongly with Ile9, Met12 and Val16 in a similar way

as the other curcumins, these interactions are slightly smaller than those for the other curcumins. Figure 3b indicates that the central part of curcumin V is a little separated from APP, compared with those for the other curcumins, additionally that curcumin V is separated from Ala19. Consequently, it is not expected curcumin V can be a potent inhibitor.

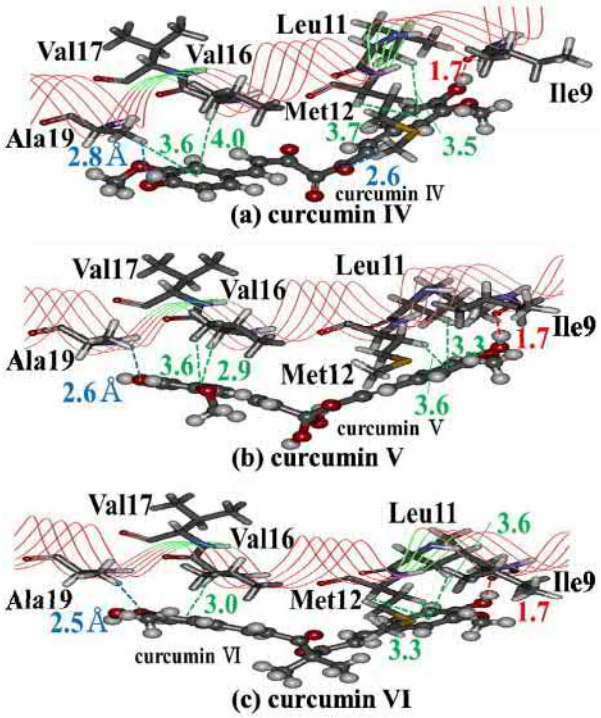


Figure 3 Interacting structures between APP residues and (a) curcumin IV, (b) curcumin V and (c) curcumin VI. Blue, green and red dotted lines indicate electrostatic, CH-π and hydrogen-bonding interactions, respectively.

B. Proposal of new curcumin derivatives as a potent inhibitor

From the above analysis of the interactions between APP and the three types of curcumins, it is expected that some modifications of curcumin VI can produce potent inhibitors to cover the Ala19 and Val17 sites of APP. We therefore proposed new curcumin derivatives, whose chemical structures are shown in Figure 4, and investigated their binding properties with APP by our *ab initio* molecular simulations.

We first replaced the methyl groups of curcumin VI with the methoxy groups to make curcumin VII as shown in Figure 4a. It is expected that the longer chain of the methoxy group will make it possible for curcumin VII to contact with APP at a shorter distance and bind strongly to APP. Next, considering that curcumin VI can bind strongly with APP by introducing a hydrophobic methyl group at the central part, we added a methylene group at the center as shown in Figure 4b (curcumin VIII). In addition, we proposed curcumin IX, in which the central methyl groups of curcumin VI are replaced with the longer ethyl groups as shown in Figure 4c. This longer ethyl group is expected to contact closer with the APP residues to be a potent inhibitor. By use of the same molecular simulations, we investigated the binding properties between APP and these new curcumin derivatives.

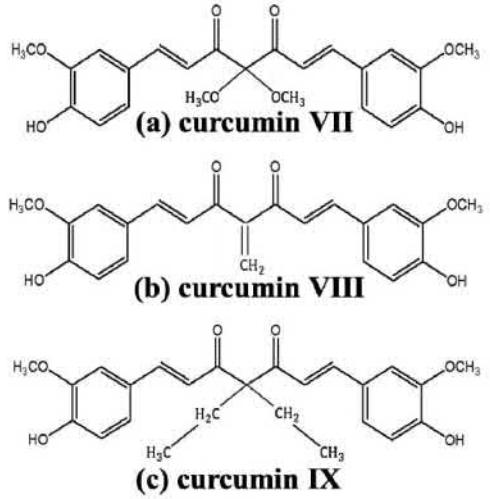


Figure 4 Chemical structures of (a) curcumin VII, (b) curcumin VIII, and (c) curcumin IX proposed in the present study.

To clarify which curcumin derivative can bind more strongly with APP, we first investigated the BEs between APP and the new curcumins. As listed in Table 2, the BE of curcumin IX is the largest among the three curcumins, although this BE is 4.3 kcal/mol smaller than that for curcumin VI. Accordingly, it is concluded from the size of BEs evaluated by FMO that curcumin VI (Figure 1d) is the most potent inhibitor with large binding affinity.

Table 2 Total energies (TE, kcal/mol) and binding energies (BE, kcal/mol) between APP and curcumin calculated by MP2/6-31G of ABINIT MP 6.0.

Ligand	TE				BE
	APP+ligand+water	APP+water	Ligand+water	Water	
curcumin Ⅶ	-10813615.9	-9880964.4	-4372145.0	-3439521.0	27.4
curcumin Ⅷ	-10312154.7	-9498827.7	-3870674.0	-3057377.1	30.1
curcumin Ⅸ	-10481962.7	-9594274.4	-4040508.3	-3152851.6	31.6

To reveal the difference in interactions between APP and curcumins for the three proposed derivatives, we investigated the IEs between each APP residue and curcumin. As shown in Figure 5, the IEs for curcumin IX are similar to those for curcumin VI, while the IEs for curcumins VII and VIII are significantly different from those for curcumin VI. In curcumins VII and VIII, the interaction with Met12 is enhanced, however, the interaction with Ile9 is significantly reduced by the replacement of the central part of curcumin VI. As a result, the BEs of curcumins VII and VIII are smaller than that of curcumin VI. To make clear the reason for this result, we compered the structures around the curcumin VII

and VIII in the complex. As shown in Figure 6a and 6b, the strong hydrogen bond between curcumin VI and Ile9 disappears completely in the complex of APP with curcumin VII/VIII. Figure 6a also indicates that the oxygen atom of the methoxy group introduced in the central part of curcumin VII interacts electrostatically with the Met12 to enhance the interaction between APP and curcumin VII. Therefore, the oxygen atom has a positive effect for enhancing the binding between APP and curcumin.

As shown in Figure 6b, curcumin VIII interacts with APP in a similar way as curcumin VII in the APP+curcumin VIII complex. The methylene group introduced at the central part directs to the APP side, however, there is no direct interaction between this group and the APP residues. As a result, the BE of curcumin VIII is not so large compared with that of curcumin VI.

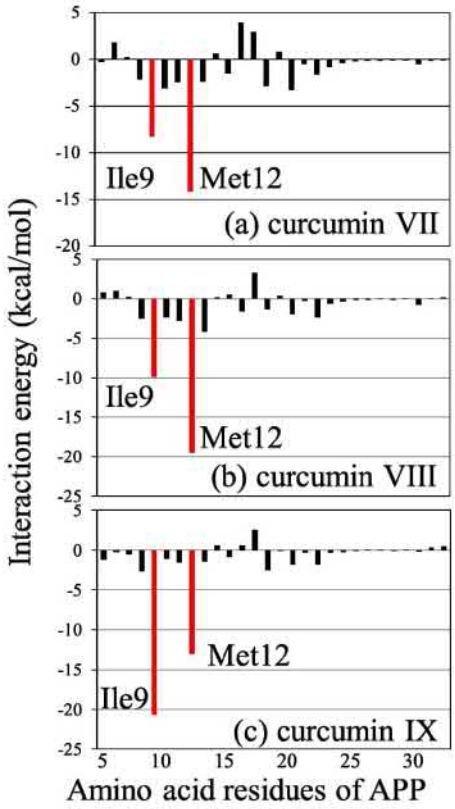


Figure 5 Interaction energies between amino acid residues of APP and (a) curcumin VII, (b) curcumin VIII, and (c) curcumin IX evaluated by MP2/6-31G method of FMO.

In contrast, curcumin IX interacts with APP in a similar way as curcumin VI, as shown in Figures 5c and 6c. the hydroxyl group of curcumin IX is hydrogen bonded at 1.6 Å distance with Ile9, while the other hydroxyl group interacts electrostatically with Ala19 at the 2.7 Å distance. It is thus expected that curcumin IX can cover the Ala19 site of APP and inhibit the attack of γ-secretase to the Ala19 site. However, because of the bulky ethyl group introduced in curcumin IX, there is a steric hindrance between APP and curcumin IX. As a result, curcumin IX cannot contact closely with APP, leading to its smaller BE with APP compared with that of curcumin VI. Consequently, from the viewpoint of covering the Ala19 site of APP, curcumin VI (Figure 1d) is the most suitable agent for inhibiting the production of Aβ42.

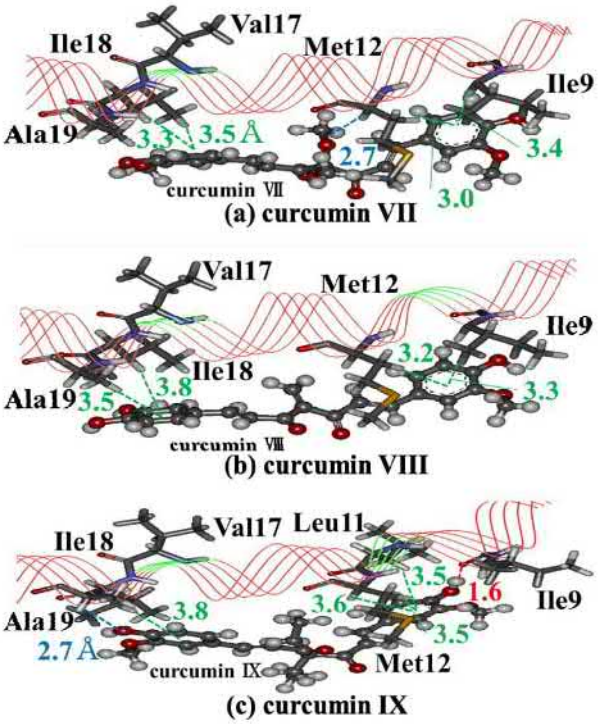


Figure 6 Interacting structures between APP residues and (a) curcumin VII, (b) curcumin VIII, and (c) curcumin IX. Blue, green and red dotted lines indicate electrostatic, CH-π and hydrogen-bonding interactions, respectively.

IV. Conclusions

By use of *ab initio* molecular simulations based on protein-ligand docking, MM optimization in water, and *ab initio* FMO calculations, we searched the stable structures of APP+curcumin complexes in water and investigated the specific interactions between APP and our proposed curcumin derivatives at an electronic level. The results are summarized as follows.

(1) Curcumin VI (Figure 1d) has the largest binding energy with APP among our proposed curcumin derivatives, indicating that curcumin VI can be a potent inhibitor against APP.

(2) Curcumin VI covers the Ala19 site of APP, indicating the possibility of curcumin VI as an inhibitor against Aβ42 production.

(3) Curcumin IX has similar binding properties as curcumin VI, however, the distance between APP and curcumin IX is more separated compared with that between APP and curcumin VI.
(4) Ile9, Met12 and of APP are important for the binding of curcumin derivatives.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO), the student exchange program between Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology, and the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of National Academy of Science of Ukraine.

REFERENCES

[1] R.N. Kalaria, G.E. Maestre, R. Arizaga, R.P. Friedland, D. Galasko, K. Hall, J.A. Luchsinger, A. Ogunniyi, E.K. Perry, F. Potocnik, M. Prince, R. Stewart, A. Wimo, Z. Zhang, P. Antuono, for the World Federation of Neurology Dementia Research Group*., "World Federation of Neurology Dementia Research Group Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: Prevalence, management, and risk factors.", Lancet Neurol, vol. 7, pp. 812-826, 2008.

[2] J.T. Jarrett, E.P. Berger, P.T. Lansbury Jr., "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.", Biochemistry, vol. 32, pp. 4693- 4697, 1993.

[3] G. Struhl, I. Greenwald, "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila.", Nature, vol. 398, pp. 522-525, 1999.

[4] A.J. Beel, C.R. Sanders, "Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases.", Cell. Mol. Life Sci., vol. 65, pp. 1311-1334, 2008.

[5] S. Weggen, *et al*., "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity.", Nature, vol. 414, pp. 212-216, 2001.

[6] T. Kukar, M.P. Murphy, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, S. Weggen, T.E. Smith, T. Ladd, M.A. Khan, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V.V. Ozols, P.Z. Anastasiadis, P. Das, A. Fauq, E.H. Koo, T.E. Golde, "Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production.", Nat. Med., vol. 11, pp. 545-550, 2005.

[7] N. Kakuda, K. Akazawa, H. Hatsuta, S. Murayama, Y. Ihara, "Suspected limited efficacy of γ-secretase modulators.", Neurobiol. of Aging, vol. 4, pp. 1101-1104, 2013.

[8] S. Funamoto, *et al*., "Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of γ-secretase.", Nature Commun., vol. 4:2529, pp. 1-12, 2013.

[9] B.B. Aggarwal, H. Ichikawa, P. Garodia, P. Weerasinghe, G. Sethi, I.D. Bhatt, M.K. Pandey, S. Shishodia, M.G. Nair, "From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer.", Springer US, vol. 595, pp. 1-75, 2007.

[10] B. Ray, S. Bisht, A. Maitra, A. Maitra, D.K. Lahiri, "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.", Journal of Alzheimer's Disease, vol. 9, pp. 434-444, 2004.

[11] K.R. Srinvasan, "The colouring matter in turmeric.", Current Science, vol. 21, pp. 311-312, 1952.

[12] F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda, "Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids.", Chem. Pham. Bull., vol. 41, pp. 1640-1643, 1993.

[13] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P. Chen, R. Kayed, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, "Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo.", J. Biol. Chem., vol. 280, pp. 5892-5901, 2005.

[14] C. Zhang, A. Browne, D. Child, R.E. Tanzi, "Curcumin decreases amyloid-β peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-β precursor protein.", J. Biol. Chem., vol. 285, pp. 28472-28480, 2010.

[15] H. Ishimura, R. Kadoya, T. Suzuki, T. Murakawa, S. Shulga, N. Kurita, "Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: *ab initio* molecular simulations.", Chem. Phys. Letts., vol. 633, pp. 139-145, 2015.

[16] M.J. Frisch, *et al*., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT., 2009.

[17] W. Chen, E. Gamache, D.J. Rosenman, J. Xie, M.M. Lopez, Y. Li, C. Wang, "Familial Alzheimer's mutations within APPTM increase Aβ42 production by enhancing accessibility of ε-cleavage site.", Nature Commun., vol. 5:3037, pp. 1-17, 2014.

[18] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstorm, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, "Autodock4 and AutodockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity.", J. Comp. Chem., vol. 16, pp. 2785-2791, 2009.

[19] B.H. Besler, K.M. Merz Jr., P.A. Kollman, "Atomic charges derived from semiempirical methods.", J. Comput. Chem., vol. 11, pp. 431-439, 1990.

[20] D.A. Case, *et al*., AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.

[21] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, "Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99SB protein force field.", Proteins, vol. 78, pp. 1950-1958, 2010.

[22] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.", *J. Chem. Phys.*, vol. 79, pp. 926-935, 1983.

[23] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, "Development and testing of a general Amber force field.", J. Comput. Chem., vol. 25, pp. 1157-1174, 2004.

[24] K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi, "Pair interaction molecularorbital method: an approximate computational method for molecular interactions.", Chem. Phys. Lett., vol. 312, pp. 319-324, 1999.

[25] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Tagushi, S. Tanaka, "Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme.", Theor. Chem. Acc., vol. 130, pp. 515-530, 2011.

[26] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, "Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme.", Chem. Phys. Lett., vol. 396, pp. 473-479, 2004.

[27] Y. Mochizuki, K. Fukuzawa, A. Kato, S. Tanaka, K. Kitaura, T. Nakano, "A configuration analysis for fragment interaction." Chem. Phys. Lett., vol. 410, pp. 247-253, 2005.

[28] K. Fukuzawa, T. Nakano, A. Kato, Y. Mochizuki, S. Tanaka, "Applications of the fragment molecular orbital method for biomacromolecules.", J. Comput. Chem., vol. 6, pp. 185-198, 2007.

Chemical Physics Letters 685 (2017) 482–489

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Research paper

Proposal for novel curcumin derivatives as potent inhibitors against Alzheimer's disease: *Ab initio* molecular simulations on the specific interactions between amyloid-beta peptide and curcumin

Shintaro Ota [a], Mitsuki Fujimori [a], Hiromi Ishimura [a], Sergiy Shulga [b], Noriyuki Kurita [a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan
[b] Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a. Osypovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2017
In final form 14 August 2017
Available online 16 August 2017

Keywords:
Amyloid precursor protein
Alzheimer's disease
Inhibitor
Fragment molecular orbital
Protein and ligand docking
In silico drug design

ABSTRACT

Accumulation of amyloid-β (Aβ) peptides in a brain is closely related with the pathogenesis of Alzheimer's disease. To suppress the production of Aβ peptides, we propose novel curcumin derivatives and investigate their binding properties with the amyloid precursor protein (APP), using protein-ligand docking as well as *ab initio* molecular simulations. Our proposed derivative (curcumin XIV) is found to have a large binding energy with APP and interacts strongly with the cleavage site Ala19 by secretase. It is thus expected that curcumin XIV can protect APP from the secretase attack and be a potent inhibitor against the production of Aβ peptides.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is recognized as being associated with the accumulation of amyloid-β (Aβ) peptide in a brain [1]. Aβ peptide species with various lengths (37–43 residues) are produced by both the β-secretase and the γ-secretase cleavages of an amyloid precursor protein (APP), which consists of 770 amino acid residues [2]. Among the species produced, Aβ40 and Aβ42 have a large population and the amount of Aβ42 is greater than that of Aβ40 in the brains of AD patients. To suppress the production of these pathogenic Aβ peptides, it is effective to inhibit the APP cleavage process by the secretases. However, since these secretases play an important role in cleaving other important proteins [3,4], inhibitors for the secretases may have several side effects. In the previous experiments [5,6], several γ-secretase modulators (GSMs) were synthesized to inhibit only the production of Aβ peptides, however these GSMs were effective only in mild AD patients [7]. Therefore, it is necessary to develop novel compounds that specifically bind not to the γ-secretase but to the cleavage site of APP and inhibit the attack of the γ-secretase to APP [8].

Curcumin derivatives have been widely used [9,10] as a conventional drug for treating many diseases such as inflammation, carcinoma, viral disease, oxidative stress induced apoptosis, neurodegenerative disease. Curcumin is contained in the roots of *Curcumae Rhizoma* and other curcuminoids such as demethoxycurcumin (curcumin II) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III) are also included at the root [11]. Marketed product of curcumin usually contains curcumin I (about 77%), curcumin II (about 17%) and curcumin III (about 3%) [12]. Curcumin was found to bind directly to Aβ peptide and inhibit the aggregation of Aβ40 and Aβ42 peptides [13], suggesting the efficacy of curcumin as a therapeutic agent for ADs. Furthermore, it was revealed that curcumin can bind to APP and interfere with the production of Aβ peptides [14]. However, the mechanism of inhibition processes caused by curcumin has yet to be elucidated.

In our previous studies [15,16], the specific interactions between a short APP peptide and the nine types of curcumin derivatives were investigated, using protein-ligand docking and *ab initio* molecular simulations. Based on the results simulated, we proposed some novel curcumin derivatives that can bind specifically to the γ-secretase cleavage site of APP and inhibit the attack of γ-secretase to APP. In the present study, we additionally proposed new curcumin derivatives and investigated their binding properties with APP in the same way as that in the previous molecular simulations [15,16], in order to elucidate which curcumin derivative is the most effective inhibitor against the Aβ peptide

* Corresponding author.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2017.08.024
0009-2614/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

production. The present results will be useful for developing new type of inhibitors against ADs.

2. Details of molecular simulations

In our previous studies [15,16], the specific interactions between APP and nine types of curcumin derivatives (curcumins I to IX) were investigated. Among them, curcumins IV to IX are our proposed derivatives, which are modified compounds of natural substance curcumin I. In fact, we substituted the two hydrogen atoms of the central part of curcumin I by the other group, because these atoms of curcumin I were found to have no remarkable contribution to the binding between APP and curcumin I in our molecular simulations. It is thus expected that this substitution may enhance the interaction between the central part of curcumin and APP.

In the present study, we additionally proposed four types of new curcumin derivatives (curcumins X–XIII) and investigated their binding properties with APP. Their chemical structures are shown in Fig. 1. In curcumin X, the two hydrogen atoms of the central part of curcumin I are substituted by a hydrophobic vinylidene group, because the previous molecular simulation [16] revealed that the curcumin derivative having a hydrophobic group at this part binds strongly to APP. In curcumin XI, the methylene group of curcumin X is substituted by two methyl groups, in order to increase the interacting sites with APP. In curcumins XII and XIII, the two hydrogen atoms of curcumin I are substituted with one or two phenyl group to enhance the hydrophobic interactions between APP and curcumin derivative. Since the γ-secretase cleavage site of APP is hydrophobic Ala19, the introduction of phenyl group is expected to enhance the hydrophobic interactions between Ala19 and the curcumin derivative. The structures of these curcumin derivatives were fully optimized by using the

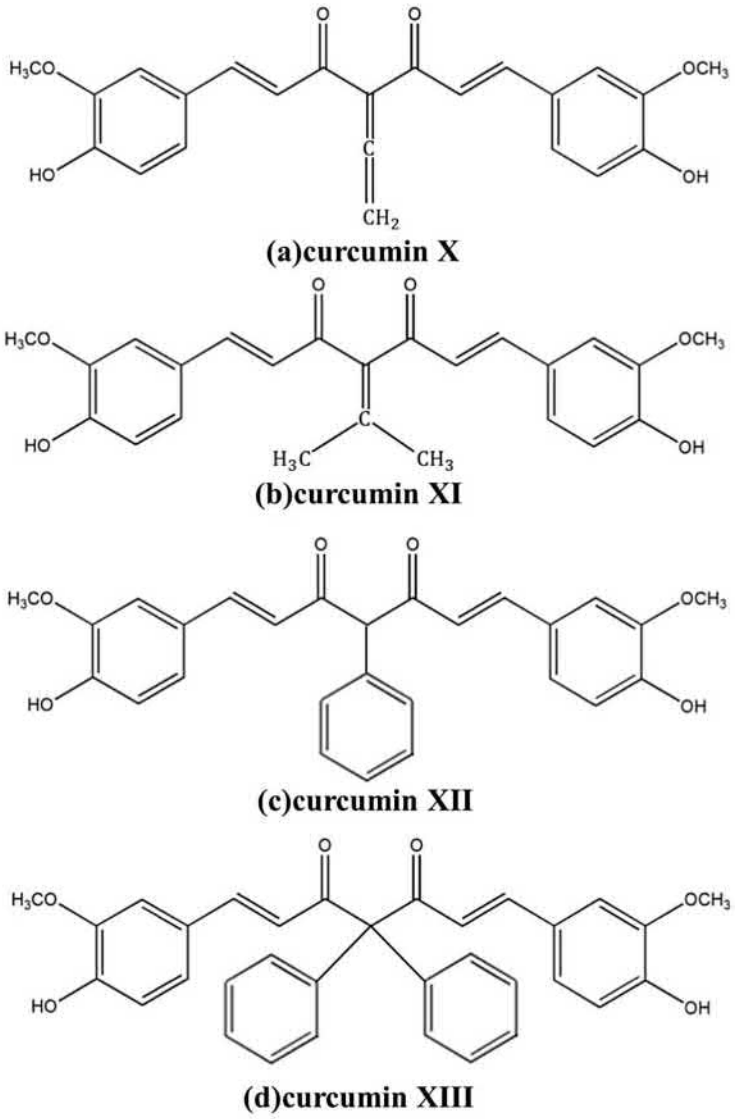


Fig. 1. Chemical structures of (a) curcumin X, (b) curcumin XI, (c) curcumin XII and (d) curcumin XIII proposed in the present study.

HF/6-31G(d, p) method of the *ab initio* molecular orbital (MO) program Gaussian09 (G09) [17] in water approximated by a polarizable continuum model of G09.

As the initial structure of APP, the NMR structure registered in Protein Data Bank (PDB) (PDB ID: 2LZ3 [18]) was used. This structure is composed of 28 amino acids from the Lys699 residue to the Lys726 residue of APP770 and contains the cleavage site (Ala713) of APP770 by the γ-secretase. Hereafter, this short APP peptide is indicated by APP. The cleavage site (Ala713) to produce Aβ42 corresponds to Ala19 of APP, while the Val711 site for producing Aβ40 corresponds to Val17 of APP.

Candidate structures and conformations of the curcumin derivatives docked to APP were generated in the same way as in the previous studies [15,16], using the automated protein-ligand docking program AutoDock4.2 [19]. The size of the docking grid box was set as $47.25 \times 47.25 \times 47.25$ Å^3, and the center of the grid box was set on the Cα atom of Ala19 of APP. For each APP + curcumin complex, 200 candidate structures were created using the genetic algorithm of AutoDock4.2, and they were classified into several clusters according to the value (1 Å) of the root mean square deviation (RMSD) between each of the structures created. It is noted that we here assigned the charge of each atom of curcumin evaluated by the restrained electrostatic potential (RESP) analysis [20] based on HF/6-31G(d) method of G09, because the RESP charge represents more accurately the charge distribution of a molecule, resulting in an accurate description of electrostatic interactions between APP and curcumin.

The candidate structures of the complexes were fully optimized in water by using the classical molecular mechanics (MM) calculation program AMBER12 [21]. In order to properly consider the solvation effect on the complex, water molecules with a layer of 8 Å around the complex were added, and the solvated structures of the complexes were optimized by the MM method. In the MM optimizations, AMBER99 SB-ILDN [22], TIP3P [23] and general Amber force field (GAFF) [24] were used for APP, water molecules and curcumin derivative, respectively. The threshold value of energy gradient for the convergence in the MM optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å. The N- and C-termini of APP were terminated by the acetyl and the methylamine groups, respectively.

From the candidate structures of APP + curcumin complex obtained by the docking, five best structures were chosen based on the docking scores estimated by AutoDock4.2. These structures were fully optimized in water by the MM method. To determine the most stable structure among the optimized ones, we performed *ab initio* fragment MO (FMO) calculations [25], using the *ab initio* FMO program ABINIT-MP Ver.6.0 [26]. From the comparison of total energies (TE) evaluated by FMO, the most stable structure of the APP + curcumin complex was determined accurately.

In the current FMO calculations, we considered the water molecules existing within a 5 Å distance from curcumin explicitly, and the *ab initio* second-order Møller-Plesset (MP2) method [27,28] of ABINIT-MP Ver.6.0 [26] was used to investigate accurately the π–π stacking, NH–π and CH–π interactions between each of APP residues and the curcumin derivatives. The 6-31G basis-set was used. Each of the APP residues, curcumin and each water molecule was assigned as a fragment, allowing this fragmentation to evaluate the interaction energies between the APP residues, curcumin derivative and solvating water molecules.

To predict the binding affinity of curcumin to APP, we evaluated the binding energy (BE) between APP and curcumin, considering water molecules explicitly. The BE is estimated from the following equation.

$$\mathrm{BE} = -\mathrm{TE}(\mathrm{APP} + \mathrm{curcumin} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}(\mathrm{APP} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}(\mathrm{curcumin} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}(\mathrm{water}).$$

Furthermore, in order to elucidate the specific interactions between APP and the curcumin derivatives, we analyzed the inter fragment interaction energy (IE) [29] obtained by the FMO calculations. From this analysis, we can highlight the important residues of APP and the important parts of curcumin for the binding between APP and curcumin at an electronic level. Based on the results, we attempted to propose some novel curcumin derivatives with greater binding affinity to APP.

3. Results and discussion

3.1. Binding properties between APP and proposed curcumins

For each APP + curcumin complex, 200 candidate structures were created by use of AutoDock4.2 [19] and classified into 151 (curcumin X), 148 (curcumin XI), 173 (curcumin XII) and 185 (curcumin XIII) clusters, respectively. Among these clusters, we selected the best five ones from the viewpoint of the docking score evaluated with AutoDock4.2. We added solvating water molecules around the selected structures, and the solvated structures were fully optimized by the classical MM method. Finally, TEs of these optimized structures were evaluated by *ab initio* FMO calculations to determine the most stable structure for each APP + curcumin complex.

In order to predict the binding affinity between APP and curcumin, we first evaluated the BEs between them by the FMO method. The BEs for all curcumin derivatives employed in our present as well as previous studies [15,16] are listed in Table 1. Among the curcumins X–XIII, curcumin XI has the largest BE, while the other curcumins (X, XII and XIII) have similar BEs with one another.

We moreover investigated the interaction energies (IEs) between each amino acid residue of APP and curcumin to elucidate the reason why curcumin XI has the largest BE, using the IFIE analysis [29] of ABINIT-MP Ver.6.0 [26]. The results for curcumins X–XIII are compared in Fig. 2. As shown in Fig. 2a, curcumin X has the largest attractive IE with the hydrophobic Ile9 residue, and Met12 also interacts strongly with curcumin X. An interacting structure between APP residues and curcumin X is shown in Fig. 3a. The hydroxy group at the terminal of curcumin X is hydrogen bonded with the oxygen atom of the Ile9 backbone, creating a large IE between Ile9 and curcumin X. In addition, the Met12 side chain interacts electrostatically

Table 1
Binding energies (BE; kcal/mol) between APP and curcumin derivatives and interaction energies (IE; kcal/mol) between Ala19 of APP and curcumin derivatives calculated by MP2/6-31G method of ABINIT-MP Ver.6.0. The results evaluated in our previous studies [15,16] are also listed for comparison.

Curcumin	BE	IE
I [15]	21.6	−3.99
II [15]	40.3	−0.18
III [15]	14.3	4.82
IV [16]	28.5	−0.89
V [16]	19.9	−2.51
VI [16]	35.9	−1.47
VII [16]	27.4	0.80
VIII[16]	30.1	0.36
IX [16]	31.6	−0.04
X	23.2	0.59
XI	28.1	−0.89
XII	23.7	−1.10
XIII	23.4	−0.51
XIV	30.1	−4.23
XV	21.8	−2.38
XVI	37.7	−0.96
XVII	56.5	−0.59

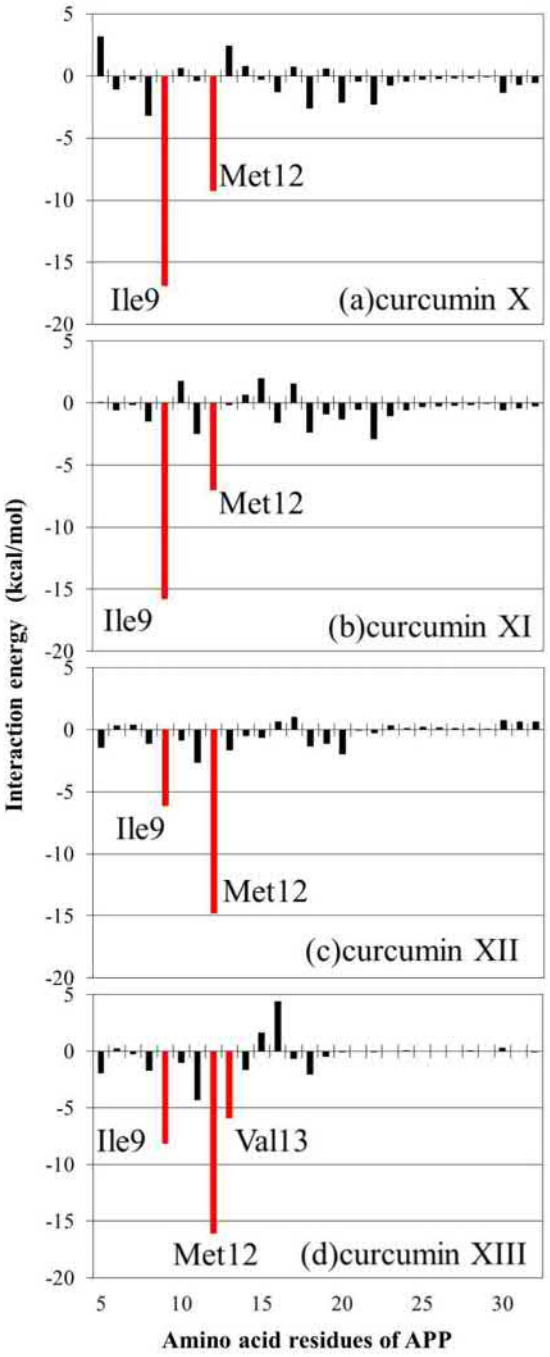


Fig. 2. Interaction energies between amino acid residues of APP and (a) curcumin X, (b) curcumin XI, (c) curcumin XII and (d) curcumin XIII evaluated by MP2/6-31G method of FMO.

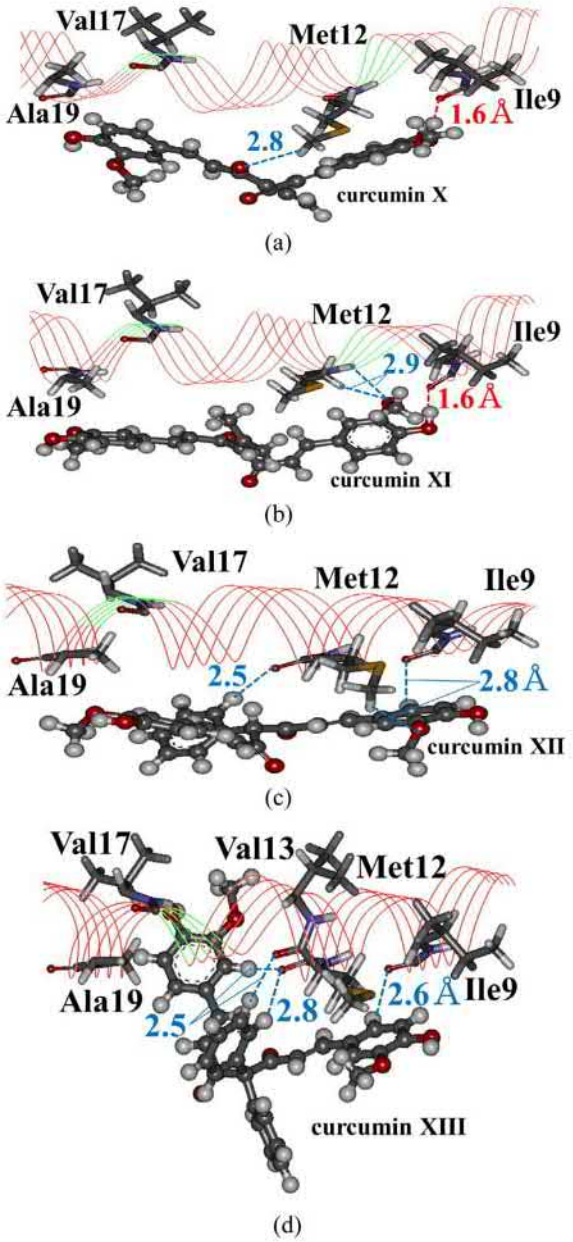


Fig. 3. Interacting structures between APP residues and (a) curcumin X, (b) curcumin XI, (c) curcumin XII and (d) curcumin XIII. Blue and red dashed lines indicate electrostatic and hydrogen-bonding interactions, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with the oxygen atom of the central part of curcumin X, while there is no strong interaction between curcumin X and Ala19/Val17, which are the γ-secretase cleavage site of APP for producing the pathogenic Aβ42 and Aβ40 peptides, respectively. Therefore, it is not expected that curcumin X can work effectively for preventing the cleavage of APP at the site of Ala19 or Val17.

As shown in Fig. 2b, curcumin XI has similar IEs to curcumin X, although curcumin XI has no significantly repulsive IE. Fig. 3b indicates that the terminal part of curcumin XI is hydrogen bonded with Ile9 and electronically interacts with Met12 and that curcumin XI has no direct interaction with Ala19 and Val17.

Curcumin XII has the largest IE with Met12 and weak interaction with Ile9, as shown in Fig. 2c. There is no hydrogen bond between curcumin XII and Ile9 as shown in Fig. 3c, although the

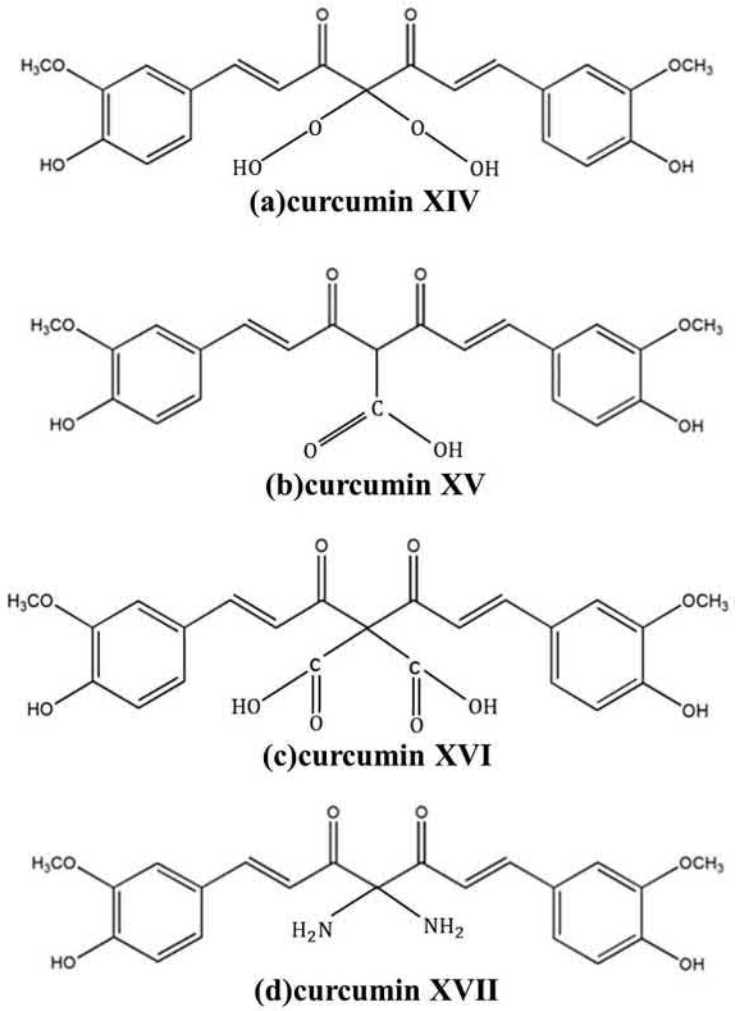


Fig. 4. Chemical structures of (a) curcumin XIV, (b) curcumin XV, (c) curcumin XVI and (d) curcumin XVII proposed in the present study.

central part and the methoxy group of curcumin XII interact strongly with the oxygen atom of the backbone and the side-chain of Met12. Curcumin XIII has strong attractive interactions with Met12, Ile9 and Val13 of APP as shown in Fig. 2d. The oxygen atoms of the backbone between Met12 and Val13 interact electrostatically with the phenyl ring at the central part of curcumin XIII, as shown in Fig. 3d.

In order to estimate the possibility that curcumin derivatives can protect the cleavage site (Ala19) of APP from the γ-secretase attack, we investigated the IEs between each of the curcumin derivatives and Ala19. As listed in Table 1, the attractive IEs for the proposed curcumins (X–XIII) are considerably smaller than that for curcumin I. It is thus elucidated from Fig. 3 and the IEs that the curcumins (X–XIII) are not expected to protect the Ala19 site from theγ-secretase attack.

3.2. Proposal of new curcumin derivatives binding to Ala19 site

Table 1 lists the BEs and IEs between APP and curcumin derivatives evaluated by our present and previous molecular simulations [15,16]. From the view point of BEs, curcumin VI is expected to bind most strongly with APP among our proposed curcumin derivatives from IV to XIII. However, in the view point of IE between the APP Ala19 and curcumin, curcumin V has the largest IE and is the most preferable for protecting the Ala19 site from the γ-secretase attack. It is also noted that curcumin I has a larger attractive interaction with Ala19 than curcumin V, indicating that curcumin I is more suitable for protecting the Ala19 site. We therefore proposed new curcumin derivatives by introducing a hydrophilic group at the central part of curcumin I. The chemical structures of these derivatives are shown in Fig. 4.

In curcumin XIV, two hydroperoxide groups were added to the central part of curcumin I, in order that these introduced groups may interact with APP residues at a closer distance. In curcumin XV, a carboxy group was introduced in the central part, while two carboxy groups were in curcumin XVI. By introducing the carboxy groups, it is expected that curcumin can interact more strongly with the oxygen atom of Ala19 backbone as well as the methyl group of Ala19 side chain. From the comparison between the results for curcumin V and the other curcumins having carboxy groups, the effect of carboxy group on the specific interactions between APP and curcumin derivative can be elucidated. In con-

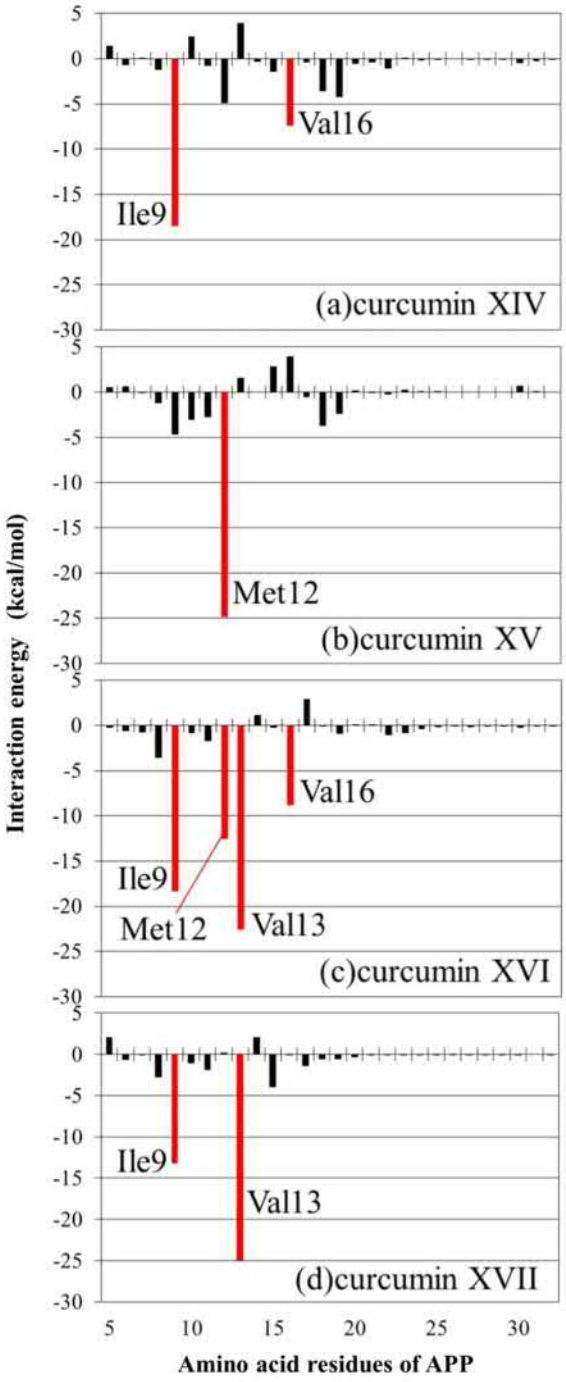


Fig. 5. Interaction energies between amino acid residues of APP and (a) curcumin XIV, (b) curcumin XV, (c) curcumin XVI and (d) curcumin XVII evaluated by MP2/6-31G method of FMO.

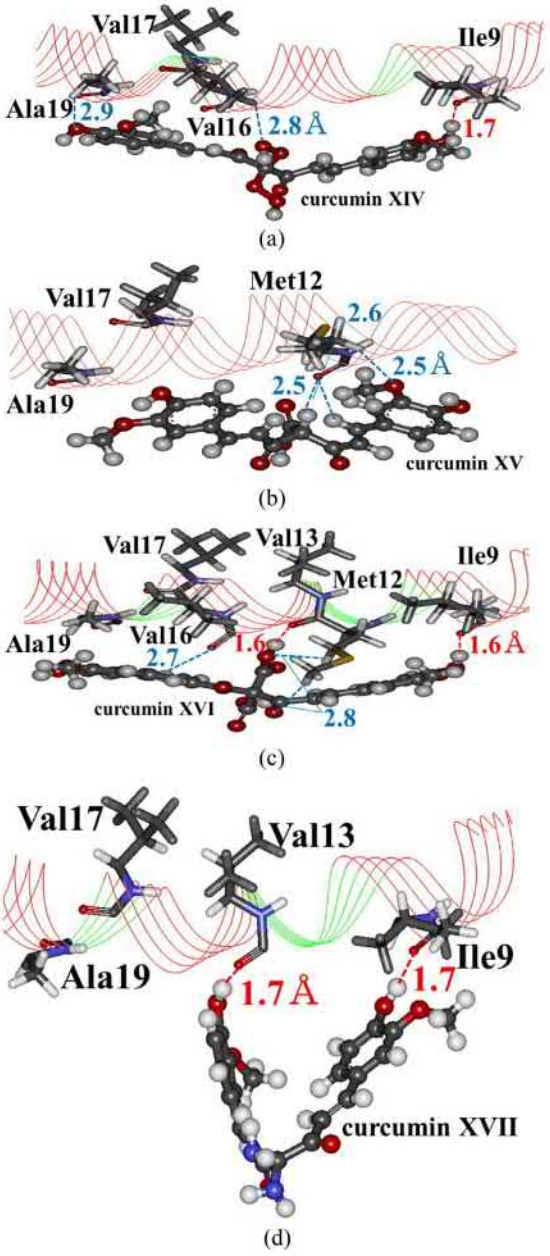


Fig. 6. Interacting structures between APP residues and (a) curcumin XIV, (b) curcumin XV, (c) curcumin XVI and (d) curcumin XVII. Blue and red dashed lines indicate electrostatic and hydrogen-bonding interactions, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

trast, curcumin XVII has two amino groups introduced at the central part, in order to elucidate the difference in the effects of carboxy and amino groups on the interactions between APP and curcumin.

We first evaluated the BEs between APP and these curcumin derivatives to clarify which derivatives can bind more strongly to APP. As listed in the last lines of Table 1, the BE of curcumin XVII is the largest among all types of curcumin derivatives employed in our study. To elucidate the reason for the difference in BEs between curcumin derivatives, we investigated the interaction energies between each APP residue and curcumins. As shown in Fig. 5a, curcumin XIV has a strong attractive interaction with only Ile9. The interacting structure between APP residues and curcumin XIV is shown in Fig. 6a. The hydroxy group at the terminal of cur-

cumin XIV is hydrogen bonded to the backbone of Ile9, causing a strong attractive interaction between Ile9 and curcumin XIV. It is noted that curcumin XIV has weak electrostatic interactions with Val16 and Ala19 of APP. In fact, the IE between curcumin XIV and Ala19 is the largest among the curcumin derivatives proposed in our study. This fact indicates the possibility that curcumin XIV may work effectively to protect the APP Ala19 site from the γ-secretase attack.

Figs. 5b and 6b show the interaction energies and interacting structure for APP + curcumin XV complex, respectively. Curcumin XV has a strong attractive interaction with only Met12, because there are significant electrostatic interactions between curcumin XV and the backbone and side chain of Met12. However, there is no strong attractive interaction between curcumin XV and Ala19/Val17 of APP.

The results for the APP + curcumin XVI complex are shown in Fig. 5c and 6c. Curcumin XVI has strong attractive interactions with hydrophobic Val13 and Ile9 residues, and it also interacts attractively with Met12 and Val16. Fig. 6c reveals that two hydroxyl groups at the central and the terminal parts of curcumin XVI are hydrogen bonded with the backbones of Ile9 as well as Met12. The central hydroxyl group also contributes to the interaction with the side chain of Met12. In addition, there is an electrostatic interaction between the oxygen atom of Val16 backbone and the hydrogen atom of the phenyl ring of curcumin XVI, resulting in the approach of the terminal part of curcumin XVI to the side chain of Ala19.

Fig. 5d and 6d show the results for APP + curcumin XVII complex. Curcumin XVII has strong attractive interactions with Val13 and hydrophobic Ile9. The hydroxyl groups at the both terminal parts of curcumin XVII are strongly hydrogen bonded with the oxygen atoms of the backbones of Ile9 and Val13, causing strong attractive interactions between curcumin XVII and these residues. The BE of curcumin XVII is the largest among the curcumin derivatives employed in our molecular simulations. However, as shown in Fig. 6d, curcumin XVII binds specifically with Ile9 and Val13 in a dogleg form, and there is no direct interaction between curcumin XVII and Ala19 and Val17 residues. Therefore, it is not expected that curcumin XVII can protect the Ala19 or Val17 site of APP effectively.

As indicated in Figs. 3 and 6, there is no π–π, CH–π and NH–π interactions between APP and our proposed curcumin derivatives. In addition, since APP has only 28 residues and an approximately linear structure, there is no distinct hydrophobic interaction found between APP and the curcumin derivatives. Accordingly, it is likely that the specific interactions between APP and the curcumin derivatives are mainly determined by the hydrogen-bonding and electrostatic interactions.

In the present molecular simulations, we investigated the electronic states for the optimized structures of the APP + curcumin complexes by *ab initio* FMO calculations. Therefore, dynamical properties of the complexes were not investigated. As a preliminary calculation, we performed a classical molecular dynamics (MD) simulation in water for the APP + curcumin XIV complex, in order to confirm that curcumin XIV keeps its contact with APP even at 300 K. The 100 ns MD simulation indicates the binding of curcumin XIV to APP. Therefore, it can be concluded that our proposed curcumin XIV keeps its specific binding to APP. By using long-time MD simulations, we are analyzing the mechanism of curcumin XIV bind to APP. The same simulations for all curcumin derivatives will be carried out and the results will be published elsewhere. Furthermore, it is necessary to make clear whether the attacking of γ-secretase to APP is protected by curcumin XIV or not. However, since this simulation requires a large amount of computational resources and a long computational time, we will conduct such simulations in the next study.

4. Conclusions

In the present study, we determined the stable structures for the solvated complexes of APP with 8 types of curcumin derivatives, using protein-ligand docking and structure optimization in water by MM method. Furthermore, using *ab initio* FMO calculations, the specific interactions between APP and the curcumin derivatives were analyzed to elucidate which curcumin can bind more strongly to APP and protect the Ala19 site from the γ-secretase attack. The results are summarized as follows.

(1) Curcumin XIV (Fig. 4a) binds strongly to APP and interacts electrostatically with the APP Ala19 residue, indicating that curcumin XIV can protect the cleavage site Ala19 of APP from the γ-secretase attack and suppress the production of pathogenic Aβ42 peptides.
(2) The backbone oxygen atoms of Ile9, Met12 and Val13 of APP are important for the hydrogen-bonding interactions between APP and the curcumin derivatives.
(3) In the curcumin derivatives introduced by a hydrophilic group at the central part, the hydroxy group contributes to the attractive interactions between the curcumin and APP, resulting in a larger binding energy.

Acknowledgments

This study was supported by the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO), the student exchange program between Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology, and the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of National Academy of Science of Ukraine.

References

[1] R.N. Kalaria, G.E. Maestre, R. Arizaga, R.P. Friedland, D. Galasko, K. Hall, J.A. Luchsinger, A. Ogunniyi, E.K. Perry, F. Potocnik, M. Prince, R. Stewart, A. Wimo, Z. Zhang, P. Antuono, for the World Federation of Neurology Dementia Research Group, World Federation of Neurology Dementia Research Group, Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors, Lancet. Neurol. 7 (2008) 812–826.
[2] J.T. Jarrett, E.P. Berger, P.T. Lansbury Jr., The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, Biochemistry 32 (1993) 4693–4697.
[3] G. Struhl, I. Greenwald, Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila, Nature 398 (1999) 522–525.
[4] A.J. Beel, C.R. Sanders, Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases, Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 1311–1334.
[5] S. Weggen et al., A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity, Nature 414 (2001) 212–216.
[6] T. Kukar, M.P. Murphy, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, S. Weggen, T.E. Smith, T. Ladd, M. A. Khan, R. Kache, J. Beard, M. Dodson, S. Merit, V.V. Ozols, P.Z. Anastasiadis, P. Das, A. Fauq, E.H. Koo, T.E. Golde, Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production, Nat. Med. 11 (2005) 545–550.
[7] N. Kakuda, K. Akazawa, H. Hatsuta, S. Murayama, Y. Ihara, Suspected limited efficacy of γ-secretase modulators, Neurobiol. Aging 4 (2013) 1101–1104.
[8] S. Funamoto et al., Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of γ-secretase, Nat. Commun. 4 (2529) (2013) 1–12.
[9] B.B. Aggarwal, H. Ichikawa, P. Garodia, P. Weerasinghe, G. Sethi, I.D. Bhatt, M.K. Pandey, S. Shishodia, M.G. Nair, From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer, Expert Opin. Ther. Targets 10 (2006) 87–118.
[10] B. Ray, S. Bisht, A. Maitra, A. Maitra, D.K. Lahiri, 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. Alzheimer Dis. 23 (2011) 61–77.
[11] K.R. Srinvasan, The colouring matter in turmeric, Curr. Sci. 21 (1952) 311–312.

[12] F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda, Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids, Chem. Pham. Bull. 41 (1993) 1640–1643.
[13] F. Yang, G.P. Lim, A.N. Begum, O.J. Ubeda, M.R. Simmons, S.S. Ambegaokar, P. Chen, R. Kayed, C.G. Glabe, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo, J. Biol. Chem. 280 (2005) 5892–5901.
[14] C. Zhang, A. Browne, D. Child, R.E. Tanzi, Curcumin decreases amyloid-β peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-β precursor protein, J. Biol. Chem. 285 (2010) 28472–28480.
[15] H. Ishimura, R. Kadoya, T. Suzuki, T. Murakawa, S. Shulga, N. Kurita, Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: ab initio molecular simulations, Chem. Phys. Letts. 633 (2015) 139–145.
[16] S. Ota, H. Ishimura, M. Fujimori, S. Shulga, N. Kurita, Ab initio molecular simulations on specific interactions between amyloid-β peptide and new curcumin derivatives, in: Proceedings of the 2016 International Conference On Advanced Informatics, Penang, Malaysia, 2016 10.1109/ICAICTA.2016.7803090.
[17] M.J. Frisch et al., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[18] W. Chen, E. Gamache, D.J. Rosenman, J. Xie, M.M. Lopez, Y. Li, C. Wang, Familial Alzheimer's mutations within APPTM increase Aβ42 production by enhancing accessibility of ε-cleavage site, Nat. Commun. 5 (3037) (2014) 1–17.
[19] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstorm, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutodockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comp. Chem. 16 (2009) 2785–2791.
[20] B.H. Besler, K.M. Merz Jr., P.A. Kollman, Atomic charges derived from semiempirical methods, J. Comput. Chem. 11 (1990) 431–439.
[21] D.A. Case et al., AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
[22] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99SB protein force field, Proteins 78 (2010) 1950–1958.
[23] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[24] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[25] K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi, Pair interaction molecularorbital method: an approximate computational method for molecular interactions, Chem. Phys. Lett. 312 (1999) 319–324.
[26] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Tagushi, S. Tanaka, Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 130 (2011) 515–530.
[27] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.
[28] Y. Mochizuki, K. Fukuzawa, A. Kato, S. Tanaka, K. Kitaura, T. Nakano, A configuration analysis for fragment interaction, Chem. Phys. Lett. 410 (2005) 247–253.
[29] K. Fukuzawa, T. Nakano, A. Kato, Y. Mochizuki, S. Tanaka, Applications of the fragment molecular orbital method for biomacromolecules, J. Comput. Chem. 6 (2007) 185–198.

ARTICLE IN PRESS

Chemical Physics Letters xxx (xxxx) xxxx

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Research paper

Proposal of therapeutic curcumin derivatives for Alzheimer's disease based on *ab initio* molecular simulations

Tomoki Shinzato[a], Riku Sato[a], Katsumi Suzuki[a], Shogo Tomioka[a], Haruki Sogawa[a], Sergiy Shulga[b], Yaroslav Blume[b], Noriyuki Kurita[a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, 1-1 Hibarigaoka, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan
[b] Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a. Osypovskogo Str., Kyiv-123 04123, Ukraine

HIGHLIGHTS

- Specific interactions between Aβ and its inhibitors were theoretically studied.
- The interactions were precisely investigated by *ab initio* molecular simulations.
- Some derivatives of curcumin-I were proposed as a novel inhibitor against Aβ.
- Curcumin-Ib has larger binding energy to Aβ than the existing inhibitors.

ARTICLE INFO

Keywords:
Alzheimer's disease
Amyloid-β
Aggregation
Drug design
Inhibitor
Fragment molecular orbital
Protein and ligand docking
Molecular mechanics
Curcumin

ABSTRACT

Aggregation of amyloid-β peptides (Aβs) in a brain is deeply involved in the onset of Alzheimer's disease, and various agents inhibiting the aggregation have been developed based on natural substances to suppress the onset. We here proposed novel curcumin derivatives as potent inhibitors against the aggregation and investigated their binding properties to Aβ, using protein-ligand docking and *ab initio* fragment molecular orbital methods. The results reveal that a curcumin derivative, in which COH_3 group of the aromatic ring is replaced by OH, binds strongly to Aβ and can be a potent inhibitor against the Aβ aggregation.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) has been one of major diseases in recent medical science. AD is a neurodegenerative disease characterized by senile plaques on the surface of the cerebral cortex and neurofibrillary tangles in a brain, and the cognitive function of the brain is remarkably decreased by AD [1–3]. The previous experiments [2,4–6] revealed that main constituent of the senile plaques are amyloid-β peptides (Aβ), which are produced from the degradation of amyloid precursor protein (APP) by the β- and γ-secretase enzymes. It was also confirmed that Aβs in the senile plaques form various aggregates by their self-assembles [7–14]. A recent study on Aβ toxicity [15] has revealed that small soluble aggregates are key to Aβ toxicity, while the dimers impair synaptic plasticity in mouse hippocampal slices, and the monomers devoid of neurotoxicity. In addition, a significant correlation was found between the Aβ toxicity and the binding to neuronal cells of Aβ trimer and tetramer, but not monomer or dimer [16].

Since the aggregation of Aβs is considered to be the first step in the onset of AD, inhibition of the aggregation is expected to be effective for treating ADs [17]. Therefore, it is expected that the compounds with higher binding affinity to Aβ can be effective for preventing the aggregation of Aβs and treating ADs [18]. For example, natural substances such as quercetin (contained in onion), EGCG (contained in green tea), apigenin (contained in celery) and curcumin-I (contained in turmeric) were proposed as the candidate inhibitors against the Aβ aggregation, and their effects were investigated [19–21]. In particular, curcumin-I and its derivatives are known to be prime candidates for inhibiting the aggregation [22]. Accordingly, there are plenty of docking simulations of curcumin derivatives to Aβ [23,24], in order to propose novel derivatives as a potent inhibitor against the Aβ

* Corresponding author.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883
Received 26 July 2019; Received in revised form 16 October 2019; Accepted 18 October 2019
0009-2614/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Tomoki Shinzato, et al., Chemical Physics Letters, https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883

aggregation. However, the binding properties of these agents with Aβ have not been elucidated yet at atomic and electronic levels.

In our previous molecular simulations [25], to propose novel inhibitors against the degradation of APP by the β- and γ-secretases, we investigated the specific interactions between the APP peptide and some curcumin derivatives, focusing on the site of the degradation of APP. In the present study, to propose novel inhibitors against the Aβ aggregation, we investigated the binding properties between Aβ monomer and some natural substances as well as curcumin derivatives at atomic and electronic levels, using *ab initio* molecular simulations. In particular, since a variety of the curcumin derivatives were synthesized recently [26] as potent therapeutic agents for many diseases, we proposed several novel curcumin derivatives and investigated their binding properties with Aβ, in order to elucidate which derivative can bind most strongly to Aβ and which amino acid residues of Aβ contribute to the binding. The present results will be useful for developing novel substances, which can inhibit the Aβ aggregation and be therapeutic agents for treating ADs.

2. Details of molecular simulations

2.1. Docking simulations of inhibitor to Aβ monomer

In the present study, we adopted the full-length Aβ(1-42) peptide composed of 42 amino acid residues (from the 1st to 42th residues of Aβ). Hereafter, Aβ(1-42) is shortly described as Aβ. Aβ monomer is very flexible-structural compound and can adopt many types of structures in water. Previous replica exchange molecular dynamics (REMD) simulations [27] obtained a variety of conformations of solvated Aβ monomer, which are comparable to the NMR structures. Therefore, we [28] employed the same REMD simulations to obtain several initial structures of Aβ monomer and determined the most stable one by *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. This structure was used as an initial structure of solvated Aβ monomer for the docking simulations of curcumin derivatives. We consider that this structure is comparable to the NMR structures.

As potent inhibitors against the Aβ aggregation, we first adopted quercetin (PDB ID: 2O3P [29]), EGCG (PDB ID: 3OOB [30]), apigenin (PDB ID: 4WO0 [31]) and curcumin-I (PDB ID: 5ZTN [32]). Their chemical structures are shown in Fig. 1. These structures were fully optimized in vacuum by the B3LYP/6-31G(d,p) method of the *ab initio* MO calculation program Gaussian 09 (G09) [33]. The charge distributions of the optimized structures were evaluated by the HF/6-31G(d) method of G09 to obtain the charge parameters in the molecular mechanics (MM) force field. It is noted that these charge parameters were used for the protein-ligand docking simulations as well as the MM optimizations, in order to describe accurately the electrostatic interactions between Aβ residues and each ligand.

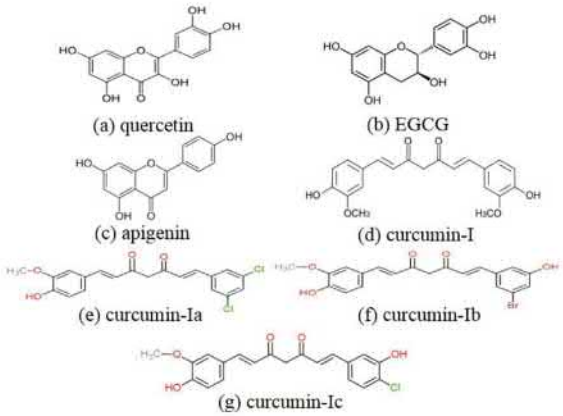


Fig. 1. Chemical structures of the existing and our proposed novel inhibitors for Aβ; (a) quercetin, (b) EGCG, (c) apigenin, (d) curcumin-I, (e) curcumin-Ia, (f) curcumin-Ib and (g) curcumin-Ic.

Because Aβ has some ligand-binding sites and it is not evident which site is more preferred by its inhibitors, it is necessary to search widely for the inhibitor binding sites. We thus conducted the following two steps of docking simulations in the same manner as our previous study [34], using the protein-ligand docking program Autodock 4.2 [35]. At the first step, we set the grid box of docking as the whole structure of Aβ is covered, and the inhibitor was docked to many sites on the entire surface of Aβ. The size of the grid box was $50 \times 40 \times 50$ Å^3, and the center of the box was set as the center of Aβ. In the docking, the Aβ structure was fixed, while the structure of inhibitor was freely relaxed, in order to obtain various conformations of the inhibitor. Using the default parameters of genetic algorithm in Autodock 4.2, 250 candidate poses were created, and they were grouped into several clusters based on the similarity of their structures. The threshold distance for clustering the poses was set as 6 Å, which is similar to the size of inhibitor.

Subsequently, we conducted more detailed docking simulations for each of the docking sites obtained by the above preliminary docking. As the candidate sites for the docking, we chose the representative structure in each of the clusters, which have more than 10 candidate poses in the first-docking. For each docking site, the grid box of docking was set as the center of gravity of the inhibitor in the representative structure, and the size of the grid box was set as approximately twice the size of the long axis of the inhibitor ($30 \times 30 \times 30$ Å^3). 250 candidate poses were created, and the threshold distance for clustering these poses was set as 2 Å, in order to search the conformation of docked inhibitor in detail. The docking was repeated for each of the candidate sites obtained by the first-docking to produce many different candidate sites of the inhibitor binding to Aβ.

2.2. Structure optimization and analysis of electronic states for Aβ + inhibitor

To obtain stable structures of the Aβ + inhibitor complexes, all representative structures of the clusters obtained by the docking simulations were fully optimized in water by the classical MM method, in which water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex were considered explicitly. The MM and MD simulation program AMBER12 [36] was used. The AMBERFF99-SBLIN force field [37], the general AMBER force field (GAFF) [38], and the TIP3P model [39] were used for Aβ, inhibitors and water molecules, respectively. The criterion for the convergence of structure optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å.

Binding properties and binding energies between Aβ and each inhibitor were calculated using the *ab initio* FMO method [40], because FMO is applicable to large biomolecules such as proteins, DNAs and RNAs and can obtain more accurate results compared with those obtained by classical MM calculations. In FMO calculations [40], the target molecule is divided into units, each of which is called "fragment", and the electronic properties of the target molecule are estimated from the electronic properties of the monomers and the dimers of the fragments. The specific interactions between the fragments can be investigated from the interaction energies obtained by the FMO calculation. In the present FMO calculations, inhibitor, each residue of Aβ and each water molecule were assigned as a fragment, because this fragmentation enables us to evaluate the interaction energies between the inhibitor and each Aβ residue.

We considered explicitly the water molecules existing within 10 Å from the inhibitor, because these water molecules have a possibility of contributing to the binding between Aβ residues and inhibitor. The number of water molecules considered are 179 for Aβ + quercetin, 156 for Aβ + apigenin, 267 for Aβ + EGCG and 260 for Aβ + curcumin-I. Based on the total energies (TEs) evaluated by the *ab initio* FMO method

for each of the structures of the Aβ + inhibitor complex, the most stable structure of the complex was determined precisely, and the most preferable binding site of inhibitor on Aβ was identified.

In addition, to predict the binding affinity between Aβ and its inhibitor, the binding energy (BE) between Aβ and its inhibitor was estimated from the TEs of the component structures using the following equation.

$$BE = TE(\text{complex} + \text{water}) - TE(A\beta + \text{water}) - TE(\text{inhibitor} + \text{water}) + TE(\text{water})$$

In the above calculations, we employed the structure of the solvated complex optimized by the classical MM method. From this structure, we extracted the structures of Aβ + water, inhibitor + water and only waters, and the TEs of these structures as well as the solvated complex were evaluated by the *ab initio* FMO calculations.

In the present *ab initio* FMO calculations, we did not consider the effect of entropy on the binding affinity, because the vibrational analysis for the solvated Aβ + curcumin complex is not practical by the *ab initio* FMO method, and because the entropic effect is likely to be not so different for the curcumin derivatives, which have almost the same chemical structure. We thus investigated binding energies between Aβ and curcumin derivatives by use of the *ab initio* FMO method and estimated the binding affinity, under the assumption that the entropic effect is the same for the curcumin derivatives.

In the FMO calculations, the MP2 [41,42]/6-31G method of the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [43] was used. Each amino acid residue of Aβ, inhibitor and each water molecule were assigned to a fragment in the FMO calculations. This fragmentation enables us to analyze the interactions between each amino acid residue of Aβ and the inhibitor affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important Aβ residues for the inhibitor binding, we analyzed the inter fragment interaction energies (IFIE) [44] obtained by the FMO calculations.

2.3. Proposal of novel curcumin derivatives as potent inhibitor against Aβ aggregation

To propose novel derivatives of curcumin-I, which have higher binding affinity to Aβ than the pristine curcumin-I as well as the existing inhibitors, we here designed new compounds based on curcumin-I, using molecular replacements acquired from the SwissBioisostere (database of molecular replacements for ligand design, http://www.swissbioisostere.ch) [45]. This database is a collection of information on 4.5 million of molecular sub-structural replacements and their information in biochemical assays created through the detection of matching molecular pairs and by the process of mining bioactivity data in the ChEMBL database.

The designed derivatives were screened by the Lipinski's rules of five [46]; molecular weight, rotatable bonds, H-bond acceptors, H-bond donors and LogP. In addition, we checked if these derivatives meet the conditions of the absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity properties or not, using PreADMET (web-based application for predicting ADME data and building drug-like library using *in silico* method, https://preadmet.bmdrc.kr) [47]. PreADMET predicts the values of physically relevant descriptors and pharmaceutically important properties of ligands that can be compared with the recommended values of ideal drugs.

For each of the curcumin-I derivatives, the binding properties to Aβ were investigated in the same way as curcumin-I. In the MM optimizations for the Aβ + derivative complexes, we considered water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex. From the BEs evaluated by the *ab initio* FMO calculations, we attempted to propose novel and potent inhibitors, which bind strongly to Aβ and prevent the Aβ aggregation.

3. Results and discussion

3.1. Binding properties between Aβ and its existing inhibitors

We first conducted the docking simulations using a large grid box and searched widely for the inhibitor binding sites on the whole structure of Aβ. As listed in Table S1 of Supplementary Information, 22 clusters were obtained for the Aβ + quercetin and Aβ + apigenin complexes, while 12 and 14 clusters were obtained for the Aβ + EGCG and Aβ + curcumin-I ones, respectively. Among these clusters, we chose the clusters containing more than 10 candidate poses, because the larger number of poses for a cluster is expected to indicate the higher probability that inhibitor binds to the site of the cluster. The representative structures in each of these clusters were employed in the second-docking simulations.

Subsequently, each inhibitor was docked again to each of the representative structures of the selected clusters. The representative structure of the cluster with the largest number of poses was employed as the candidate structure for each of the clusters obtained by the first-docking simulations. These structures were fully optimized in water by the MM method. Finally, the total energies (TEs) of the optimized structures were precisely evaluated by the *ab initio* FMO calculations, and the most stable structure among them was determined based on the TEs. As listed in Table 1, the rank 4 structure is the most stable for the Aβ + quercetin, Aβ + apigenin and Aβ + curcumin-I complexes, while the rank 2 structure is the most stable for the Aβ + EGCG complex. It is noted that the rank 1 structure proposed by the docking simulations using Autodock4.2 [35] is not the most stable, and that the *ab initio* FMO calculations are needed for determining the most stable structure accurately. Fig. S1 of Supplementary Information shows the most stable structures of the complexes, indicating that each of the inhibitors has significantly different binding modes to Aβ.

To predict the binding affinity of these existing inhibitors to Aβ, the BE between Aβ and the inhibitor was estimated from the TEs of the component structures evaluated by the *ab initio* FMO method. As listed in Table 2, BE of quercetin is −64.2 kcal/mol, which is considerably larger than those for the other existing inhibitors. It is therefore expected that quercetin has the largest binding affinity to Aβ among the four existing inhibitors. To elucidate the reason for the significant difference in BEs, we moreover investigated the interaction energies (IEs) between amino acid residues in Aβ and each inhibitor, using the FMO method. As shown in Fig. 2(a), quercetin interacts strongly with Asp7 (−40.4 kcal/mol) and Glu11 (−35.3 kcal/mol). It is noted that these interactions can be overestimated, because solvating water molecules are explicitly considered and continuum model of solvation is not considered. These Aβ residues are hydrogen bonded with the hydroxyl groups of quercetin at 1.4 Å (Asp7) and 1.5 Å (Glu11), respectively, as shown in Fig. S2(a) of Supplementary Information. Therefore, it is elucidated that Asp7 and Glu11 as well as the hydroxyl groups of quercetin are important for the strong binding between Aβ and quercetin.

Apigenin has a similar binding mode to Aβ as quercetin, as shown in Fig. 2(c), although the different residues (Glu11 and Lys16) contribute to the binding. Fig. S2(c) indicates that the hydroxyl group of apigenin is hydrogen bonded with the oxygen atom of the backbone of Glu11 at 2.2 Å distance, and that the oxygen atom of C=O group interacts strongly with the NH_3^+ group of Lys16 side chain, resulting in strong attractive interactions between apigenin and Glu11/Lys16. From the comparison between the results for quercetin and apigenin shown in Fig. S2(a) and S2(c), it is expected that hydroxyl groups of the benzene ring in these inhibitors contribute significantly to the strong interactions between Aβ and these inhibitors.

In contrast, the binding mode of EGCG is significantly different from that of quercetin as shown in Fig. 2(b), although the chemical structure of EGCG is similar to that of quercetin. EGCG interacts strongly with Gln15 and Ala30, however these interactions are weaker than those in

Table 1
Total energies (TEs: kcal/mol) of Aβ + inhibitor complexes evaluated by *ab initio* FMO calculations for several structures optimized in water by MM method; (a) Aβ + Quercetin, (b) Aβ + EGCG, (c) Aβ + Apigenin, (d) Aβ + Curcumin-I, (e) Aβ + Curcumin-Ia, (f) Aβ + Curcumin-Ib and (g) Aβ + Curcumin-Ic.

(a) Quercetin

Rank	TE	ΔTE
1	−19250253.9	2617.5
2	−19250129.0	2742.3
4	−19252871.4	0.0
5	−19252457.6	413.8
6	−19250226.4	2645.0
8	−19250327.6	2543.8
9	−19250219.5	2651.9
10	−19252429.4	442.0

(b) EGCG

Rank	TE	ΔTE
1	−23815087.1	84.1
2	−23815171.1	0.0
3	−23814957.5	213.7
4	−23815042.3	128.8

(c) Apigenin

Rank	TE	ΔTE
1	−18057192.9	2557.0
3	−18057208.4	2541.5
4	−18059749.9	0.0
5	−18059603.4	146.5
6	−18057125.3	2624.6
8	−18057190.6	2559.3
11	−18057165.0	2584.9
17	−18059511.5	238.4

(d) Curcumin-I

Rank	TE	ΔTE
1	−23222652.6	227.7
2	−23222876.0	4.3
4	−23222880.3	0.0

(e) Curcumin-Ia

Rank	TE	ΔTE
1	−22963301.6	5.0
2	−22963306.6	0.0
4	−22963277.1	29.5

(f) Curcumin-Ib

Rank	TE	ΔTE
1	−23857062.5	327.3
2	−23857389.8	0.0
4	−23857144.0	245.9

(g) Curcumin-Ic

Rank	TE	ΔTE
1	−22578855.2	197.0
2	−22579052.2	0.0
4	−22578856.4	195.8

the Aβ + quercetin complex. As shown in Fig. S2(b), some hydroxyl groups of EGCG are hydrogen bonded to Glu15 and Ala30, although these hydrogen bonding interactions are not so strong as those (Fig. S2(a)) in the Aβ + quercetin complex. Therefore, it is clarified from the comparison between quercetin and EGCG that the change in the positions of the hydroxyl groups or C═O group can affect significantly on the interactions between Aβ and these inhibitors.

Table 2
Binding energies (BE: kcal/mol) between Aβ and inhibitors and interaction energies (IE: kcal/mol) between amino acid residue of Aβ and inhibitors evaluated by *ab initio* FMO calculations for the most stable structures of the complexes. IEs are listed for the residues having large attractive interaction with the inhibitor.

Inhibitor	BE	IE (residue)
quercetin	−64.2	−40.4(Asp7), −35.3(Glu11)
EGCG	−51.8	−20.6(Gln15), −20.0(Ala30)
apigenin	−41.4	−36.0(Glu11), −30.5(Lys16)
curcumin-I	−34.4	−20.4(Val18)
curcumin-Ia	−61.3	−33.2(Glu11)
curcumin-Ib	−75.6	−47.2(Lys16)
curcumin-Ic	−65.0	−17.5(Gln15), −25.1(Ala30)

Curcumin-I has a different framework structure from quercetin, so that the binding mode is significantly different from that for quercetin, as shown in Figs. 2(d) and S2(d). Curcumin-I interacts strongly with only Val18, resulting in its weaker binding energy compared with that of quercetin, as listed in Table 2. In fact, Fig. S2(d) clearly indicates that curcumin-I is hydrogen bonded with only Val18, and the interactions between curcumin-I and Aβ residues are significantly weaker compared with the other existing inhibitors. Consequently, there is a possibility that the replacement of some groups of curcumin-I can enhance its binding to Aβ significantly.

3.2. Proposal for novel derivatives of curcumin-I

We here employed curcumin-I as the lead compound (LC) to develop bioisosteres, which would serve as more efficient Aβ inhibitors. A series of heteroaryl benzamide derivatives were designed by replacing the important fragments of curcumin-I, using molecular replacements acquired from the SwissBioisostere database [45]. Because the hydroxyl groups of the benzene ring in the existing inhibitors but for curcumin-I contribute significantly to the strong interactions between Aβ and these inhibitors, the OH and OCH_3 groups of the benzene ring of curcumin-I were replaced by the other groups, in order to enhance the interaction between curcumin-I and Aβ. Totally 59 derivatives were created by use of the SwissBioisostere database [45].

These 59 derivatives were screened by the Lipinski's rules of five [46]; molecular weight, rotatable bonds, H-bond acceptors, H-bond donors and the octanol-water partition coefficient (LogP). As listed in Table 3, 15 derivatives meet the rules to be selected as candidate inhibitors. In addition, we checked if these derivatives meet the conditions of the absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity properties or not, using PreADMET software [47]. In the present study, blood–brain barrier (BBB) penetration, plasma protein binding (PPB), human intestinal absorption (HIA), heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cell lines (Caco2) and toxicity to mouse and rat were considered. As listed in Table 4, it was confirmed that PPB, HIA and Caco2 values for our proposed derivatives fulfill the conditions, although BBB values indicate low absorption of some derivatives. In addition, some of the derivatives can have toxicity to carcino-mouse or carcino-rat.

Among the 15 curcumin derivatives listed in Table 4, we here employed the three derivatives (inhibitors 2, 14 and 15), because they do not have toxicity to the mouse and rat. These derivatives are assigned as curcumin-Ia, curcumin-Ib and curcumin-Ic, respectively, and their chemical structures are shown in Fig. 1(e), 1(f) and 1(g). These three derivatives were docked to Aβ, and their binding properties were investigated precisely by the *ab initio* FMO calculations.

The results of the docking simulations for these derivatives are listed in Table S1, indicating that the top ranked three clusters for the Aβ + derivative complexes have more than 10 candidate poses, while

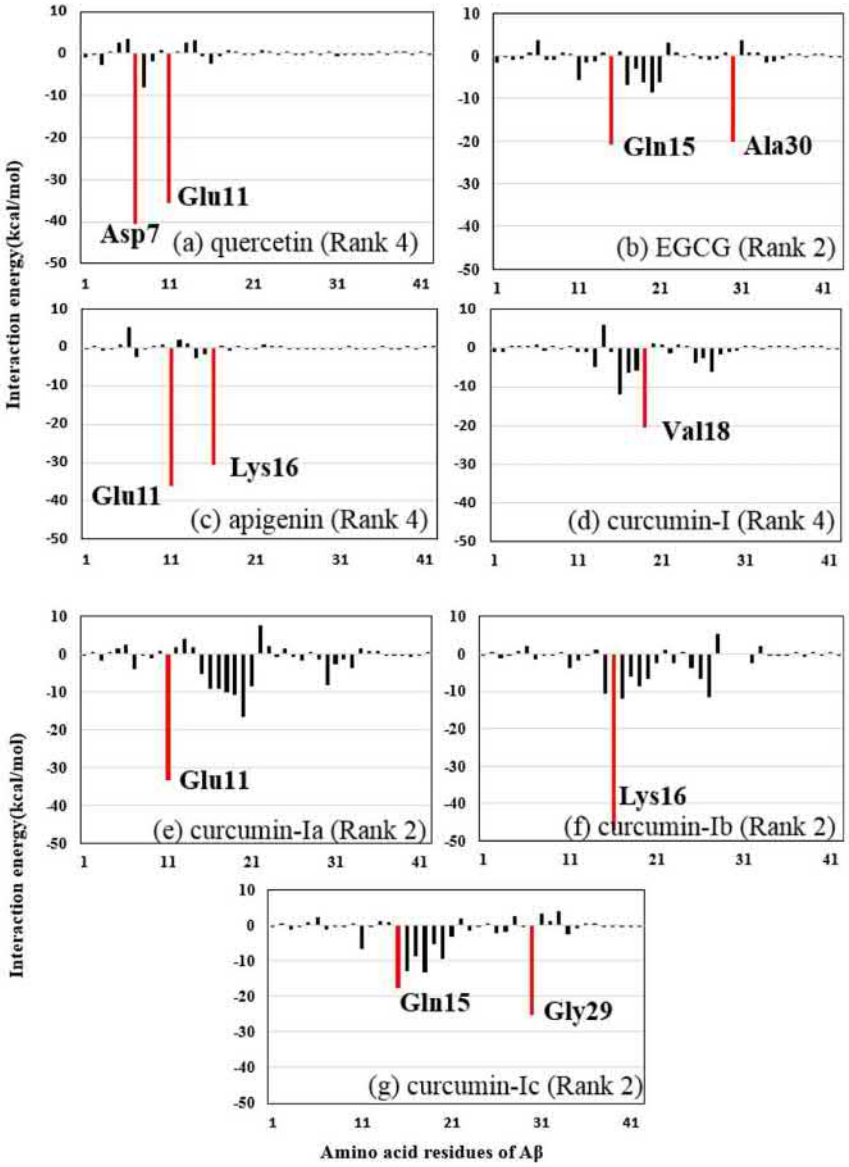


Fig. 2. Interaction energies between each amino acid residue of Aβ and inhibitors; (a) quercetin, (b) EGCG, (c) apigenin, (d) curcumin-I, (e) curcumin-Ia, (f) curcumin-Ib and (g) curcumin-Ic. Strong attractive interactions are shown by the red-lines with the residue binding to inhibitor.

the other clusters have a few candidate poses. Therefore, we employed these top ranked clusters in the second docking, and the docked structures obtained for the clusters were fully optimized in water by the MM method. Finally, the TEs of the optimized structures were evaluated precisely by *ab initio* FMO calculations to determine the most stable structures of the Aβ + derivative complexes.

The evaluated TEs are listed in Table 1(e), 1(f) and 1(g), indicating that the rank-2 structure is the most stable for all complexes. Therefore, we investigated the BEs between Aβ and each of these derivatives for the rank-2 structures, to predict the binding affinity of the curcumin derivatives to Aβ. As listed in Table 2, their BEs are significantly larger than that of the pristine curcumin-I, indicating that the replacement of the OH and OCH_3 groups of curcumin-I enhances its binding to Aβ. Among the three derivatives, curcumin-Ib has the largest BE (−75.6 kcal/mol). It is noted that this value is significantly larger than those of the existing inhibitors, as listed in Table 2. It is thus expected that curcumin-Ib binds strongly to Aβ and can be a potent inhibitor against the Aβ aggregation.

To elucidate the reason for these large BEs of the curcumin-I derivatives, we analyzed the interaction energies between Aβ residues and each of the derivatives. As shown in Fig. 2(e) and S2(e), curcumin-Ia interacts strongly with Glu11 (−33.2 kcal/mol), because the OH group of the non-changed benzene ring has a strong hydrogen bond with Glu11 side chain at 1.6 Å distance. It is noted that the replaced groups of the other benzene ring have no significant interaction with Aβ residues, as shown in Fig. S2(e).

Curcumin-Ib has very strong attractive interaction (−47.2 kcal/mol) with Lys16, as shown in Fig. 2(f). This interaction is considered to be main reason for the large BE between curcumin-Ib and Aβ. Fig. S2(f) elucidates that curcumin-Ib forms two hydrogen bonds with Lys16, and

Table 3
Our proposed novel inhibitors against Aβ meeting Lipinski's rules of five [43]; (1) molecular weight (MW) is less than 500 g/mol, (2) number of rotatable bonds is equal or less than 10, (3) number of H-bond acceptors is less than 10, (4) number of H-bond donors is less than 5, and (5) octanol-water partition coefficient (LogP) is less than 4.15.

Inhibitor	MW	Rotatable bonds	H-bond acceptors	H-bond donors	LogP
1	382.41	9	6	1	1.69
2	391.24	7	4	1	3.33
3	412.43	10	7	1	1.38
4	380.43	8	5	2	2.45
5	366.41	8	5	2	2.24
6	374.79	7	5	1	3.23
7	391.24	7	4	1	3.33
8	448.25	7	4	1	3.07
9	380.43	10	5	1	2.45
10	590.15	7	5	2	3.20
11	401.25	7	4	1	2.96
12	431.28	3	5	1	2.61
13	388.41	7	5	2	2.48
14	417.25	7	5	2	2.40
15	372.80	7	5	2	2.29

Table 4
Our proposed novel inhibitors against Aβ meeting the ADMET rules [44]. The different pharmacokinetic properties and their acceptable range; (1) Blood-brain barrier (BBB) is > 2.0 suggested high absorption to central nervous system (CNS), while BBB is < 0.1 indicates very low absorption, (2) Plasma protein binding (PPB) is > 80% for strong protein binding, (3) Human intestinal absorption (HIA) calculated at pH 7.4 is between 0 and 20% for poor absorption, 20–70% for moderate absorption, 70–100% for fair absorption, (4) Caco2 permeability (nm/sec) is larger than 70 for high permeability, while is smaller than 4 for low permeability, and (5) toxicity for carcino-mouse and carcino-rat.

Inhibitor	ADME				Toxicity	
	BBB	PPB	HIA	Caco2	Mouse	Rat
1	0.03	89.19	96.22	51.86	negative	positive
2	0.12	89.26	96.22	49.62	negative	negative
3	0.11	88.71	96.22	50.58	negative	positive
4	0.21	89.34	96.31	53.03	negative	positive
5	0.20	89.96	96.22	47.61	negative	positive
6	0.18	89.29	96.22	48.41	positive	negative
7	0.36	89.81	96.31	52.88	positive	negative
8	0.36	90.27	96.31	51.21	negative	positive
9	0.33	89.70	96.31	52.04	positive	negative
10	1.01	100.00	97.00	21.90	positive	positive
11	0.12	89.61	96.22	49.62	negative	positive
12	0.11	88.92	96.22	50.58	positive	negative
13	0.21	89.59	96.31	53.03	negative	positive
14	0.16	90.26	96.22	48.94	negative	negative
15	0.28	89.93	96.31	52.86	negative	negative

additionally the oxygen atom of the OH group of the other benzene ring has two weak hydrogen bonds with the NH groups of the backbone of both Phe19 and Phe20. These additional hydrogen bonds contribute to enhancing the binding affinity of curcumin-Ib to Aβ.

In Aβ + curcumin-Ic complex, curcumin-Ic has two hydrogen bonds with Gln15 and Gly29, as shown in Fig. S2(g), and these residues contribute mainly to the interactions between Aβ and curcumin-Ic as indicated in Fig. 2(g). The replaced OH group forms a hydrogen bond with the oxygen atom of Gly29 backbone. In addition, the oxygen atom at the center of curcumin-Ic forms a hydrogen bond with Gln15.

It is noted that the BE of curcumin-Ib is remarkably larger than those of the existing inhibitors against Aβ, as indicated in Table 2. Fig. 2(f) reveals that the main reason for this large BE is the strong interaction between curcumin-Ib and Lys16. By replacing OCH_3 group with OH group in curcumin-I, the sterically bulky part of curcumin-I is vanished away. As a result, curcumin-Ib can enter into the ligand-binding site of Aβ more easily and form many hydrogen bonds with the backbones of Aβ residues, as indicated in Fig. S2(f). Accordingly, our proposed curcumin-Ib is expected to bind strongly to Aβ and inhibit the aggregations of Aβs. MD simulations for the Aβ + derivative complexes are underway to confirm that the derivatives can keep their specific binding to the Aβ residues. In addition, since we have already conducted the MD simulations for the Aβ hexamer [48] and the Aβ nonamer [49], we will carry out the same MD simulations for these aggregates with curcumin-Ib, in order to elucidate the effect of curcumin-Ib on the structures of the aggregates.

4. Conclusions

In the present study, we investigated the binding properties between Aβ monomer and some existing inhibitors at an electronic level, using protein-ligand docking simulations, MM optimizations and *ab initio* FMO calculations. Based on the results and the SwissBioisostere database [45], we proposed three derivatives of curcumin-I meeting the Lipinski's rules of five [46] and having pharmaceutically important properties predicted by PreADMET software [47]. In addition, the binding properties of these derivatives to Aβ monomer were investigated to find that curcumin-Ib (Fig. 1(f)) has larger binding energy to Aβ than the existing inhibitors, indicating its possibility as a potent inhibitor against the Aβ aggregation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was supported by The Nitto Foundation, the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO), and the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of the National Academy of Sciences of Ukraine. This collaboration study was carried out under the official agreement of international collaboration study and the student exchange program between the Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883.

References

[1] F.M. Laird, H. Cai, A.V. Savonenko, M.H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H.C. Chiang, G. Xu, V.E. Koliatsos, D.R. Borchelt, D.L. Price, H.K. Lee, P.C. Wong, BASE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions, J. Neurosci. 25 (2005) 11693–11709.
[2] D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, Physiol. Rev. 81 (2001) 741–766.
[3] M. Rak, M.R. Del Bigio, S. Mai, D. Westaway, K.M. Gough, Dense-core and diffuse Aβ plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy, Biopolymers 87 (2007) 207–217.
[4] M.A. Findeis, The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease, Pharmacol. Ther. 116 (2007) 266–286.
[5] S.W. Pimplikar, Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease, Int. J. Biochem. Cell Biol. 41 (2008) 1261–1268.
[6] R. Tycko, Characterization of amyloid structures at the molecular level by solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy, Methods Enzymol. 413 (2006) 103–122.
[7] O.N. Antzutkin, J.J. Balbach, R.D. Leapman, N.W. Rizzo, J. Reed, R. Tycko, Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of β-

sheets in Alzheimer's β-amyloid fibrils, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (2000) 13045–13050.
[8] A.T. Petkova, R.D. Leapman, Z. Guo, W.M. Yau, M.P. Mattson, R. Tycko, Self-propagating, molecularlevel polymorphism in Alzheimer's β-amyloid fibrils, Science 307 (2005) 262–265.
[9] A.K. Paravastu, R.D. Leapman, W.-M. Yau, R. Tycko, Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's β-amyloid fibrils, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (2008) 18349–18354.
[10] J.C. Chan, N.A. Oyler, W.M. Yau, R. Tycko, Parallel β-sheets polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10–39 of the yeast prion protein Ure2p, Biochemistry 44 (2005) 10669–10680.
[11] F. Shewmaker, R.B. Wickner, R. Tycko, *Proc*, Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel β-sheet structure, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 19754–19759.
[12] M. Török, S. Milton, R. Kayed, P. Wu, T. McIntire, C.G. Glabe, R. Langen, Structural and dynamic features of Alzheimer's Aβ peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling, J. Biol. Chem. 277 (2002) 40810–40815.
[13] A. Der-Sarkissiant, C.C. Jao, J. Chen, R. Langen, Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling, J. Biol. Chem. 278 (2003) 37530–37535.
[14] S. Luca, W.-M. Yau, R. Leapman, R. Tycko, Peptide conformation and supramolecular organization in amylin fibrils: constraints from solid-state NMR, Biochemistry 46 (2007) 13505–13522.
[15] G.M. Shankar, S. Li, T.H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N.E. Shepardson, I. Smith, F.M. Brett, M.A. Farrell, M.J. Rowan, C.A. Lemere, C.M. Regan, D.M. Walsh, B.L. Sabatini, D.J. Selkoe, Amyloid β-protein dimers isolated directly from Alzheimer brains impair synaptic plasticity and memory, Nat. Med. 14 (2008) 837–842.
[16] M.K. Jana, R. Cappai, C.L.L. Pham, G.D. Ciccotosto, Membrane-bound tetramer and trimer Aβ oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons, J. Neurochem. 136 (2016) 594–608.
[17] D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman, C. Glabe, Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs, J. Biol. Chem. 267 (1992) 546–554.
[18] A.T. Petkova, R.D. Leapman, Z.H. Guo, W.M. Yau, M.P. Mattson, R. Tycko, Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, Science 307 (2005) 262–265.
[19] A.V. Kristen, S. Lehrke, S. Buss, D. Mereles, H. Steen, P. Ehlermann, S. Hardt, E. Giannitsis, R. Schreiner, U. Haberkorn, P.A. Schnabel, R.P. Linke, C. Röcken, E.E. Wanker, T.J. Dengler, K. Altland, H.A. Katus, Green tea halts progression of cardiac transthyretin amyloidosis: an observational report, Clin. Res. Cardiol. 101 (2012) 805–813.
[20] A. Espargaro, T. Ginex, M.M. Vadell, M.A. Busquets, J. Estelrich, D.M. Torrero, F.J. Luque, R. Sabate, Combined in vitro cell-based/in silico screening of naturally occurring flavonoids and phenolic compounds as potential anti-Alzheimer drugs, J. Nat. Prod. Lett. 6437 (2016) 1–12.
[21] S.T. Ngo, D.T. Truong, N.M. Tam, M.T. Nguyen, EGCG inhibits the oligomerization of amyloid beta (16–22) hexamer: Theoretical studies, J. Mol. Graph. Model. 76 (2017) 1–10.
[22] S. Shishodia, G. Sethi, B.B. Aggarwal, Curcumin: getting back to the roots, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1056 (2005) 206–217.
[23] A. Battisti, A.P. Piccionello, A. Sgarbossa, S. Vilasi, C. Ricci, F. Ghetti, F. Spinozzi, A.M. Gammazza, V. Giacalone, A. Martorana, A. Lauria, C. Ferrero, D. Bulone, M.R. Mangione, P.L.S. Biagio, M.G. Ortore, Curcumin-like compounds designed to modify amyloid beta peptide aggregation patterns, RSC Adv. 7 (2017) 31714–31724.
[24] X. Zhang, Y. Tian, Z. Li, X. Tian, H. Sun, H. Liu, A. Moore, C. Ran, Design and synthesis of curcumin analogues for in vivo fluorescence imaging and inhibiting copper-induced cross-linking of amyloid beta species in Alzheimer's disease, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 16397–16409.
[25] S. Ota, M. Fujimori, H. Ishimura, S. Shulga, N. Kurita, Proposal for novel curcumin derivatives as potent inhibitors against Alzheimer's disease: *ab initio* molecular simulations on the specific interactions between amyloid-beta peptide and curcumin, Chem. Phys. Lett. 685 (2017) 482–489.
[26] D. Zhou, N. Ding, S. Zhao, D. Li, J.V. Doren, Y. Qian, X. Wei, X. Zheng, Synthesis and evaluation of curcumin-related compounds containing inden-2-one for their effects on human cancer cells, Biol. Pharm. Bull. 37 (2014) 1977–1981.
[27] N.G. Sgourakis, M. Merced-Serrano, C. Boutsidis, P. Drineas, Z. Du, C. Wang, A.E. Garcia, Atomic-level characterization of the ensemble of the Aβ(1–42) monomer in water using unbiased molecular dynamics simulations and spectral algorithms, J. Mol. Biol. 405 (2011) 570–583.
[28] A. Okamoto, A. Yano, K. Nomura, S. Higai, N. Kurita, Stable conformation of full-length amyloid-b (1–42) monomer in water: replica exchange molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital simulations, Chem. Phys. Lett. 577 (2013) 131–137.
[29] S. Holder, M. Zemskova, C. Zhang, M. Tabrizizad, R. Bremer, J.W. Neidigh, M.B. Lilly, Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase, Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 163–172.
[30] D.V. Urusova, J.H. Shim, D.J. Kim, S.K. Jung, T.A. Zykova, A. Carper, A.M. Bode, Z. Dong, Epigallocatechin-gallate suppresses tumorigenesis by directly targeting Pin1, Cancer Prev Res (Phila). 4 (2011) 1366–1377.
[31] M. Cianci, C. Folli, F. Zonta, P. Florio, R. Berni, G. Zanotti, Structural evidence for asymmetric ligand binding to transthyretin, Acta Crystallogr. Sect. D. 71 (2015) 1582–1592.
[32] S. Banerjee, C. Ji, J.E. Mayfield, A. Goel, J. Xiao, J.E. Dixon, X. Guo, Ancient drug curcumin impedes 26S proteasome activity by direct inhibition of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115 (2018) 8155–8160.
[33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. calmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Darich, A.D.Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[34] H. Ishimura, R. Kadoya, T. Suzuki, T. Murakawa, S. Shulga, N. Kurita, Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: Ab initio molecular simulations, Chem. Phys. Lett. 577 (2015) 139–145.
[35] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[36] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
[37] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, Proteins 78 (2010) 1950–1958.
[38] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollma, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[39] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[40] D.G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method, Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 7562–7577.
[41] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, A parallelized integral-direct second-order Møller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442–452.
[42] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.
[43] S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, Electron-correlated fragment-molecular-orbital calculations for biomolecular and nano systems, Phys. Chem. Chem. Phys. 22 (2014) 10310–10344.
[44] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, S. Tanaka, Intra- and intermolecular interactions between cyclic-AMP receptor protein and DNA: Ab initio fragment molecular orbital study, J. Comput. Chem. 27 (2006) 948–960.
[45] M. Wirth, V. Zoete, O. Michielin, W. Sauer, SwissBioisostere: a database of molecular replacements for ligand design, Nucleic Acids Res. 41 (2013) D1137–D1143.
[46] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Delivery Rev. 23 (1997) 3–25.
[47] S. Shah, B. Patel, J.K. Savjani, Pharmacophore mapping based virtual screening, molecular docking and ADMET studies of ROCK II inhibitors, Mult. Scler. Relat. Disord. 21 (2018) 35–41.
[48] H. Ishimura, S. Tomioka, R. Kadoya, K. Shimamura, A. Okamoto, S. Shulga, N. Kurita, Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: ab initio fragment molecular orbital calculations in water, Chem. Phys. Lett. 672 (2017) 13–20.
[49] S. Tomioka, H. Sogawa, T. Shinzato, H. Ishimura, A. Okamoto, Y. Blume, S. Shulga, N. Kurita, Effect of Zn ion on the structure and electronic states of Aβ nonamer: molecular dynamics and ab initio molecular orbital calculations, Mole. Simu. 45 (2019) 706–715.

5.2 Взаємодія похідних куркуміну з FtsZ протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio*

Chemical Physics Letters 692 (2018) 166–173

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Research paper

Specific interactions between mycobacterial FtsZ protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular simulations

Mitsuki Fujimori [a], Haruki Sogawa [a], Shintaro Ota [a], Pavel Karpov [b], Sergey Shulga [b], Yaroslav Blume [b], Noriyuki Kurita [a,*]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan
[b] Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osypovskogo str., Kyiv-123 04123, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 November 2017
In final form 15 December 2017
Available online 16 December 2017

Keywords:
FtsZ protein
Cell division
Mycobacterium tuberculosis
Inhibitors
Curcumin derivatives
Fragment molecular orbital
Protein ligand interaction

ABSTRACT

Filamentous temperature-sensitive Z (FtsZ) protein plays essential role in bacteria cell division, and its inhibition prevents *Mycobacteria* reproduction. Here we adopted curcumin derivatives as candidates of novel inhibitors and investigated their specific interactions with FtsZ, using *ab initio* molecular simulations based on protein–ligand docking, classical molecular mechanics and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. Based on FMO calculations, we specified the most preferable site of curcumin binding to FtsZ and highlighted the key amino acid residues for curcumin binding at an electronic level. The result will be useful for proposing novel inhibitors against FtsZ based on curcumin derivatives.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most widespread infection diseases caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), which can easily get drug resistance. Drugs such as isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol are currently used for the treatment of TB, although there are many *Mtb* strains having resistance to these drugs. In particular, the *Mtb* strains having resistance to multiple drugs are called multidrug-resistant TB (MDR-TB), and the number of MDR-TBs is growing rapidly. It is therefore needed to develop new anti-TB drugs targeting the most conservative proteins [1]. In addition, the treatment of TB should be completed in a short time, because prolongation of the TB treatment may cause new MDR-TBs. Therefore, it is required to develop novel potent anti-TB drugs, which can shorten the treatment period [2].

As a candidate of anti-TB drugs, new compounds were proposed, which suppress the growth of *Mtb* by inhibiting the division of *Mtb* cell [3]. These drugs are targeted to cytoskeletal protein FtsZ (Filamentous temperature-sensitive Z), which plays an essential role in the cell division mechanism. At the beginning of prokaryotic cell division, FtsZs form a cytokinetic ring (Z-ring) in the center of the cell, and this Z-ring acts as scaffold for association of other proteins to the cell division. Subsequently, new cell wall is developed between the dividing cells. Finally, by closing the Z-ring, the cell is divided into two cells [4]. Therefore, it is expected that the inhibitor against the Z-ring formation can suppress the *Mtb* cell growth. In addition, the inhibitor is likely to have a small side effect, because the amino acid residues in the homologous sites of the *Mtb* FtsZ are significantly different from those of the tubulin isoforms in human.

We here adopted curcumin derivatives as a candidate of novel inhibitor against the formation of FtsZ Z-ring. Curcumin is natural product and contained in the root of *Curcumae Rhizoma*, and other curcuminoids such as demethoxycurcumin (curcumin II) and bisdemethoxycurcumin (curcumin III) shown in Fig. 1 are also included in the root [5]. Curcumin derivatives have been widely used [6,7] as a conventional drug for treating many diseases such as inflammation, carcinoma, viral disease, oxidative stress induced apoptosis, and neurodegenerative disease. In fact, curcumin I was found to suppress bacterial cell proliferation by inhibiting the formation of FtsZ Z-ring [8]. We therefore adopted curcumins I, II and III as candidate agents for inhibiting the *Mtb* FtsZ activity. Since there are many ligand-binding pockets in *Mtb* FtsZ, the binding site of curcumin I on FtsZ and the specific interactions between FtsZ and curcumin I are not elucidated yet. This is a bottleneck in the development of more potent inhibitors for FtsZ.

* Corresponding author.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.12.045
0009-2614/© 2017 Published by Elsevier B.V.

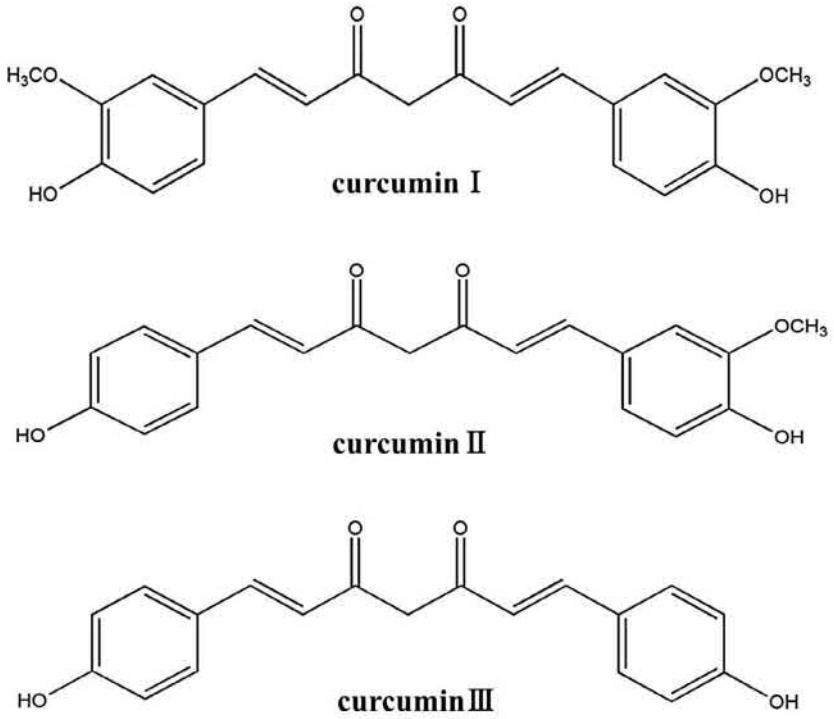


Fig. 1. Chemical structures of natural curcumins (I, II and III).

In the present study, we investigated the specific interactions between *Mtb* FtsZ and some curcumin derivatives, to clarify which sites of *Mtb* FtsZ are more preferable for the curcumin binding, using *ab initio* molecular simulations based on protein-ligand docking, classical molecular mechanics (MM) optimizations and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. In addition, we attempted to reveal which curcumin derivative can bind more strongly with FtsZ and inhibit the aggregation of FtsZ. The result will be useful for proposing novel anti-TB drugs based on curcumin derivatives.

2. Details of *ab initio* molecular simulations

2.1. Construction and optimization of FtsZ+curcumin structure in water

In the present study, we employed the X-ray crystal structure of *Mtb* FtsZ+citrate complex (PDB ID: 1RQ2 [9]) as the initial structure for FtsZ modelling. This PDB structure is a dimer of FtsZ composed of two subunits (Chain-A and Chain-B). Because only Chain-A has the complete ligand-binding pockets, this structure was used as the initial structure of FtsZ. The missing residues in the PDB structure were completed using a protein modelling server I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) [10,11]. Among five candidate models produced by I-TASSER, the model 1 was selected, because it has the best C-score (−0.73). FtsZ has four His residues, and their protonated states were assigned based on the pKa value predicted by PROPKA3.1 program [12,13]. Since all His residues of FtsZ have pKa value larger than 6 and are located on the surface of FtsZ, they were assigned as Hip^+ protonation. The N- and C-termini of FtsZ were terminated by the acetyl group, and the amine group, respectively.

Three types of curcumins (curcumin I, II and III) were employed as inhibitors of FtsZ. Their chemical structures are shown in Fig. 1, and their structure models were optimized using the B3LYP/6-31G (d,p) method of the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian09 (G09) [14]. To obtain charge parameter used in the MM force field, the charge distributions of the optimized structures were evaluated using the HF/6-31G(d) method of G09. It is noted that these charge distributions were used for the docking simulation as well as the MM optimizations, in order to accurately describe the electrostatic interactions between FtsZ and curcumin.

FtsZ has several ligand-binding sites, and it is not evident which site is more preferred by curcumins. In order to search widely for the curcumin binding site on FtsZ, we conducted the following two steps of docking simulations, using the protein-ligand docking program Autodock4.2 [15]. At the first step, we set the grid box of docking as the whole structure of FtsZ is covered, and curcumin was docked to many sites on the entire surface of FtsZ. The size of grid box was $59.85 \times 59.85 \times 59.85$ Å^3, and the center of the box was set as the center of FtsZ. In the docking, FtsZ structure was fixed, while the structure of curcumin was freely relaxed, in order to obtain various types of structures for the docked curcumin. The number of candidate poses created was 250, and the threshold distance for clustering these poses was set as 10 Å. We employed the default scoring function based on AMBER force field, which includes van der Waals, electrostatic, hydrogen-bonding and desolvation terms as well as the change in entropy of ligand. As candidate structures for FtsZ+curcumin complex, we first chose the representative structures in the clusters, which have more than 10 candidate poses.

Subsequently, we conducted more detailed second-docking simulations for each of the curcumin docking sites obtained by the first-docking. For each docking site, we set the grid box of dock-

ing as the center of gravity of curcumin in the representative structure obtained by the first-docking, and the size of grid box is set as $30 \times 30 \times 30^3$. It is noted that the spacing between the adjacent grid points was set as 0.375 Å for searching in detail the preferable docking site of curcumin on FtsZ. The number of candidate poses was 250, and the threshold distance for clustering these poses was set as 2 Å. The docking was repeated for each of the candidate sites obtained by the first-docking, in order to produce many different candidate sites of the curcumin docking.

To obtain stable structures of the FtsZ+curcumin complex, all candidate structures obtained by the second-docking simulations were fully optimized in water by use of classical MM method. In the optimizations, 2100 water molecules existing within 8 Å from the surface of the complex were considered explicitly. The MM and molecular dynamics simulation program AMBER12 [16] was used. The AMBERFF99-SBLIN force field [17], the TIP3P model [18] and the general AMBER force field (GAFF) [19] were used for FtsZ, water molecules and curcumins, respectively. The criterion for the convergence of structure optimization was set as 0.0001 kcal/mol/ Å.

2.2. FMO calculations for FtsZ+curcumin complex

To elucidate the specific interactions and binding affinity between FtsZ and curcumin, we investigated electronic properties of the FtsZ+curcumin complex in explicit waters, using the *ab initio* FMO method [20]. This method have been applied for many biomolecules and obtained accurate results comparable to experiments. It is noted that the water molecules existing within 10 Å from the curcumin were considered explicitly, in order to describe accurately the effect of these water molecules on the specific interactions between FtsZ and curcumin. The number of water molecules is 140 for FtsZ+curcumin-I, 117 for FtsZ+curcumin-II and 116 for FtsZ+curcumin-III, respectively. To predict the binding affinity between FtsZ and curcumin, the binding energy (BE) between FtsZ and curcumin was estimated from the total energies (TEs) of the component structures using the following equation.

$$\mathrm{BE} = -\mathrm{TE}(\mathrm{complex} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}(\mathrm{FtsZ} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}(\mathrm{curcumin} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}(\mathrm{water})$$

In the present *ab initio* FMO calculations, we did not consider the effect of entropy on the binding affinity, because the vibrational analysis for the solvated FtsZ+curcumin complex is not practical by the *ab initio* FMO method, and because the entropic effect is likely to be not so different for the curcumin derivatives I, II and III, which have almost the same chemical structure. We thus investigated binding energies between FtsZ and curcumin by use of the *ab initio* FMO method and estimated the binding affinity, under the assumption that the entropic effect is the same for the curcumin derivatives.

In the FMO calculations, the MP2 [21,22]/6-31G method of the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [23] was used. Each amino acid residue of FtsZ, curcumin and each water molecule were assigned to a fragment in the FMO calculations, because this fragmentation enables to analyze the interactions between each of FtsZ residues and curcumin affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important FtsZ residues for the curcumin binding, we analyzed the inter fragment interaction energies (IFIE) [24] obtained by the FMO calculations.

3. Results and discussion

3.1. Structures of FtsZ+curcumin complexes

In the present study, we classified the curcumin binding sites on FtsZ into the eight sites as shown in Fig. 2. GDP site is the GDP binding site of FtsZ+GDP complex (PDB ID: 1RQ2 [9]), while TZT site is the TZT binding site of the FtsZ+TZT complex (PDB ID: 3E22 [25]). Site, structurally equivalent to Taxol-binding site in tubulin, was observed to be located between the two subunits existing near the T7 loop of FtsZ [26]. In addition, since the present molecular simulations produced other different stable sites of curcumin binding on FtsZ, we defined the other five binding sites (C, E, F, G and H) on FtsZ as shown in Fig. 2.

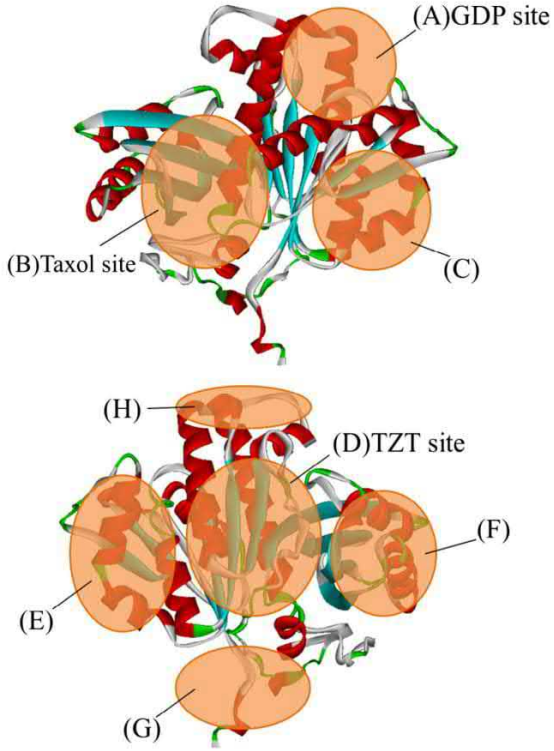


Fig. 2. Our proposed curcumin binding sites on FtsZ.

To search widely for the curcumin binding sites on FtsZ, we first docked curcumins to the whole structure of FtsZ. As listed in Table 1, 21, 18 and 20 clusters were created for the complexes of FtsZ with curcumin-I, II and III, respectively. These clusters are ranked by their lowest binding energies (BE) estimated by AutoDock4.2 [15]. The larger number of poses for each cluster indicates the higher possibility that curcumin binds to the site of the cluster. Table 1 indicates that curcumin-I has the highest possibility to bind to the F-site, while curcumins II and III have the highest possibility to bind to the D-site. In addition, the docked poses of curcumin-II and III have larger populations on some specific sites compared to those of curcumin-I. Therefore, it can be predicted from Table 1 obtained by AutoDock that curcumins I, II and III might have different binding sites on FtsZ.

In the second-docking simulations, we selected the representative structures in the clusters, which have more than 10 candidate poses in the first-docking, and curcumin was docked to each of the specific sites in the structures. Among the 21 clusters of FtsZ +curcumin-I, 12 clusters have more than 10 poses. We conducted the second-dockings for these clusters, with setting the center of grid box as the representative structure of each cluster. As listed in Table S1(a) of the supporting information, the poses created by the second-docking prefer to concentrate on a particular cluster, which has the largest number of poses and is indicated by boldface in Table S1. For all clusters except for the cluster-1 obtained by the

Table 1
Results of the first docking of curcumin I, II and III to FtsZ; lowest binding energies (BE), number of poses and site of the docking are listed for each of the clusters obtained by AutoDock4.2 [15].

	Curcumin-I			Curcumin-II			Curcumin-III		
Cluster	BE	Pose	Site	BE	Pose	Site	BE	Pose	Site
1	−3.35	**20**	D	−3.49	**26**	A	−4.48	6	B
2	−3.33	**10**	A	−3.43	**19**	B	−4.16	**54**	D
3	−3.28	**14**	A	−3.36	**43**	D	−4.15	**38**	D
4	−3.16	**35**	F	−3.35	**18**	F	−3.84	**26**	A
5	−3.03	**19**	F	−3.31	7	A	−3.40	**13**	F
6	−2.99	**21**	B	−3.19	**36**	D	−3.35	9	F
7	−2.83	3	F	−3.02	**11**	F	−3.14	**10**	B
8	−2.76	**14**	F	−2.96	**24**	F	−2.99	6	E
9	−2.74	5	F	−2.84	**12**	**B**	−2.98	**17**	G
10	−2.72	6	C	−2.83	**17**	E	−2.90	8	A
11	−2.70	**28**	D	−2.81	**11**	A	−2.87	**19**	F
12	−2.62	**13**	B	−2.69	5	H	−2.86	**13**	C
13	−2.61	**16**	B	−2.35	9	G	−2.78	**11**	D
14	−2.47	**14**	G	−2.32	3	B	−2.50	5	G
15	−2.45	5	B	−2.01	5	B	−2.46	5	H
16	−2.29	6	H	−1.89	2	H	−2.44	1	H
17	−2.17	**10**	H	−1.78	1	F	−2.40	4	G
18	−1.88	6	G	−1.18	1	G	−2.38	3	F
19	−1.76	2	G				−2.09	1	F
20	−1.74	2	G				−1.77	1	E
21	−0.72	1	E						

first-docking, the cluster with the largest poses appears among the five best ranked clusters obtained by the second-docking. The representative structures in the clusters were selected as candidate structures of FtsZ+curcumin-I complex. As for the cluster-1, the representative structure in the rank 8 cluster was employed, since it has the largest number of poses. As for curcumins II and III, 10 and 9 clusters obtained by the first-docking were selected, respectively. The 250 docking-poses of the curcumins were created for each of the clusters. The results are listed in Table S1(b) and S1 (c) of the supporting information.

By using the two steps of docking simulations shown above, we can obtain 11, 10 and 9 docking sites on FtsZ for curcumin-I, II and III, respectively. It is noted that the ranking based on the lowest binding energy obtained by AutoDock has a possibility of causing an error in ranking, because the energy is not accurately calculated by *ab initio* molecular orbital method. In our present study, we fully optimized the candidate structures of FtsZ+curcumin in water by classical MM method, and finally the total energies of the optimized structures were accurately calculated by *ab initio* FMO method to determine the most stable structure of FtsZ+curcumin complex.

The candidate structures of FtsZ+curcumin-I complex obtained by the two step docking simulations were fully optimized in water by the AMBER MM method. The optimized structures are compared in Fig. S1(a) of the supporting information, and the binding sites of curcumin-I for each structure are listed in the last column of Table 2. For example, curcumin-I in Rank-1 and Rank-11 binds to the TZT-binding site, while curcumin-I in Rank-2 and Rank-3 binds to the GDP-binding site, indicating that curcumin-I can affect the TZT or GDP binding to FtsZ. As for curcumin-II, Table 2 and Fig. S1(b) indicate that, curcumin-II binds to the TZT-binding site in Rank-3, Rank-6 and Rank-10 structures, while curcumin-II of Rank-1 and Rank-11 bind to the GDP-binding site. Table 2 also indicates that curcumin-III prefers to bind to the TZT-binding site of FtsZ. These optimized structures are compared in Fig. S1(c).

For determining the most preferable binding site of curcumin on FtsZ, it is indispensable to calculate accurately the total energy of the FtsZ+curcumin complex. Classical MM as well as AutoDock simulations are not suitable for such calculations, because these simulations cannot calculate the energies accurately. In contrast, *ab initio* MO methods can obtain accurate total energies of molecules, although this method is very time-consuming. In the present study, we employed the *ab initio* FMO method to obtain accurately the total energies of all structures for FtsZ + curcumin complexes. As listed in Table 2, Rank-11 structure of FtsZ+curcumin-I is at least 110 kcal/mol more stable than the other structures obtained by the present simulations. As for the curcumins II and III, the most stable structure is at least 47 and 77 kcal/mol more stable than the other structures, respectively. Therefore, it can be concluded from Table 2 that the structures of Rank-11 of curcumin-I, Rank-3 of curcumin-II and Rank-2 of curcumin-III are the most preferable among the candidate structures obtained by the present AutoDock and MM simulations. Table 2 also reveals that curcumins prefer to bind to the TZT-binding site of FtsZ.

The most preferable binding sites of curcumin I, II and III to FtsZ are compared in Fig. S2 of the supporting information, which elucidates that all curcumins bind to the TZT-binding site of FtsZ in a similar way. To reveal the reason for this specific binding to the TZT-binding site, the interaction energies (IE) between each amino acid residue of FtsZ and curcumin-I were analyzed by the *ab initio* FMO calculations. As shown in Fig. 3(a), curcumin-I binding to the TZT-binding site has strong attractive interactions with Ile214, Asp313 and Gly316. On the other hand, when curcumin-I binds to the Taxol-binding site, curcumin-I binds strongly with only Glu231 and Glu302 residues of FtsZ as shown in Fig. 3(b). Fig. 3 (c) shows the difference in IEs for the above binding conformations, indicating that there is at most 30 kcal/mol difference in IE depending the binding site of curcumin-I on FtsZ, and that curcumin-I can interact with many FtsZ residues in the TZT-binding site of FtsZ to be the most preferable binding site for curcumin-I. In fact, as shown in Fig. S3 of the supporting information, curcumin-I interacts with many residues in the TZT-binding site of FtsZ, while curcumin-I interacts with a few residues at the Taxol-binding site.

3.2. Binding properties between FtsZ and curcumin I, II and III

We first investigated the binding energies (BEs) between FtsZ and curcumin I, II and III, in order to clarify which curcumin binds more strongly to FtsZ and to be a potent inhibitor against FtsZ. The BEs evaluated by the *ab initio* FMO calculations are 76.6 (curcumin-I), 76.0 (curcumin-II) and 90.4 kcal/mol (curcumin-III), indicating

Table 2
Total energies (TE: kcal/mol) of FtsZ+curcumin complex calculated by *ab initio* FMO method; 1st and 2nd indicate the ranking of the first and second dockings, respectively, and the sites of docking are shown in Fig. 2.

Curcumin	1st	2nd	TE (kcal/mol)	ΔTE	Site
I	1	8	−93796476.6	110.2	TZT
	2	1	−93796263.6	323.2	GDP
	3	3	−93796308.0	278.8	GDP
	4	2	−93796370.6	216.2	F
	5	2	−93796130.9	456.0	F
	6	2	−93796355.1	231.7	Taxol
	8	5	−93796227.3	359.5	F
	11	**1**	**−93796586.8**	**0**	**TZT**
	12	5	−93796298.4	288.4	Taxol
	13	3	−93796263.2	323.6	Taxol
	14	1	−93795977.8	609.0	G
	17	5	−93796147.2	439.6	H
II	1	7	−92625828.9	526.5	GDP
	2	3	−92626002.0	353.3	Taxol
	3	**3**	**−92626355.4**	**0**	**TZT**
	4	1	−92625994.5	360.8	F
	6	2	−92626308.6	46.8	TZT
	7	1	−92625793.3	562.0	F
	8	1	−92625977.0	378.3	F
	9	3	−92626189.5	165.8	Taxol
	10	5	−92626210.7	144.6	TZT
	11	4	−92625916.2	439.1	GDP
III	**2**	**1**	**−92506940.9**	**0**	**TZT**
	3	1	−92506864.3	76.6	TZT
	4	2	−92506812.3	128.6	GDP
	5	5	−92506526.5	414.4	F
	7	2	−92506719.7	221.3	Taxol
	9	4	−92506572.4	368.5	G
	11	1	−92506729.2	211.7	F
	12	3	−92506505.1	435.8	C
	13	5	−92506813.2	127.7	TZT

that curcumin-III binds more strongly with FtsZ than the other curcumins.

To elucidate the reason for the larger BE for curcumin-III, we moreover investigated the interaction energies (IEs) between FtsZ residues and curcumin by the FMO method. As shown in Fig. 4, all curcumins interact strongly with many residues existing around the TZT-binding site of FtsZ. To make clear the difference in IE between curcumins, the difference in IE was analyzed in detail. Fig. 5(a) is for the difference between curcumins I and II, indicating that the difference in IE is not so significant between curcumins I and II. In contrast, IEs of curcumin-III are significantly different from those of curcumins-I and II, as shown in Fig. 5(b) and (c). In particular, Ala218, Gln255, Phe312 and Thr326 interact more strongly with curcumin-III. It is thus expected that these residues contribute to the larger BE for curcumin-III.

The interacting structures of these FtsZ residues and curcumins I, II and III are compared for revealing the difference in binding modes for curcumins. As shown in Fig. 6(a), curcumin-I has hydrogen bonding and electrostatic interactions with the backbone of Ile214. As a result, curcumin-I and Ile214 interact most strongly (−19 kcal/mol) as indicated in Fig. 4(a). In addition, curcumin-I has a hydrogen bond with Gly316 and Thr326 at the 1.69 and 1.85 Å distance and interacts electrostatically with Asp313, Arg152 and Asp349. As shown in Fig. 6(b) and (c), curcumin-II has similar binding modes with the FtsZ residues as curcumin-I. In addition, curcumin-II interacts with Thr220, Phe312, Glu333 and Lys336 residues.

In contrast, curcumin-III has different binding modes from curcumins I and II, as shown in Fig. 6(d). In particular, the positions of the central oxygen atoms of curcumin-III are significantly different from those for curcumins I and II. As a result, curcumin-III has two hydrogen bonds with Gln255 and Phe312 at 1.85 and 1.83 Å distance, respectively. Furthermore, curcumin-III interacts

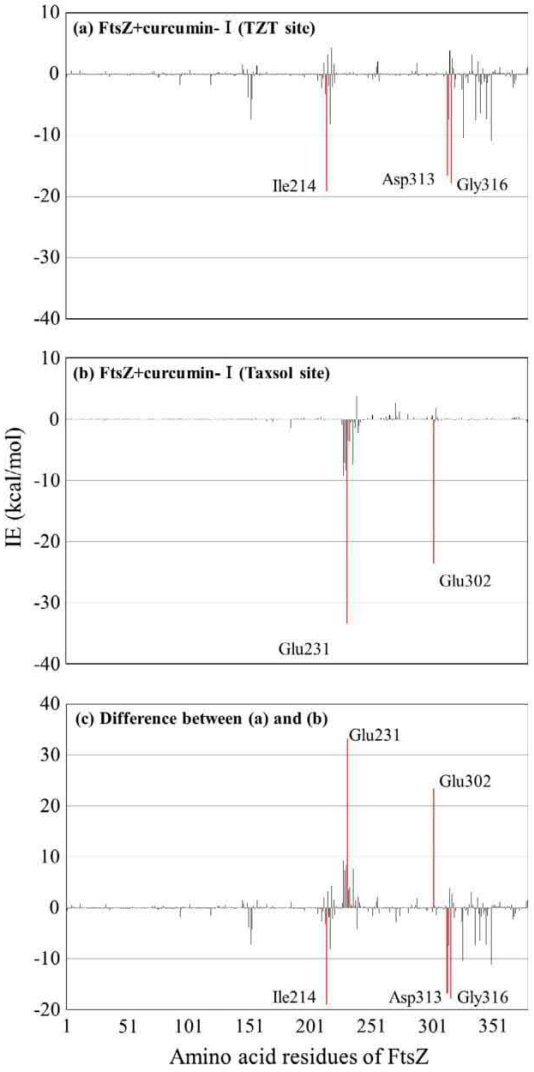


Fig. 3. Interaction energy (IE) between FtsZ residues and cucumin-I; (a) curcumin-I is docked to TZT site, (b) curcumin-I is docked to Taxol site and (c) difference between (a) and (b).

electrostatically with Gln255, creating strong attractive interactions with Gln255 (−15 kcal/mol) and Phe312 (−12 kcal/mol), as shown in Fig. 4(c). In a similar way as curcumins I and II, curcumin-III has hydrogen bonds with Thr326 and Ile214 and interacts electrostatically with Arg152 and Asp349.

As shown in Fig. 6(d), the two carbonyl groups at the center of curcumin-III direct to Gln255 and Phe312 residues of FtsZ, and two hydrogen bonds are formed between the oxygen atoms of the groups and these residues. In addition, the methylene group at the center interacts with Ala218 at 2.85 Å. As the results, the IEs between these residues and curcumin-III become larger than those for curcumins I and II as indicated in Fig. 5(b) and (c). It is thus likely that these interactions contribute to the larger BE between FtsZ and curcumin-III, compared to those for curcumins I and II.

To elucidate the reason for the difference in structure around the center of curcumins, we compared their interacting structures with some residues (Arg152, Ile214, Ala218, Gln255 and Phe312) of FtsZ in Fig. S4 of the supporting information. As shown in

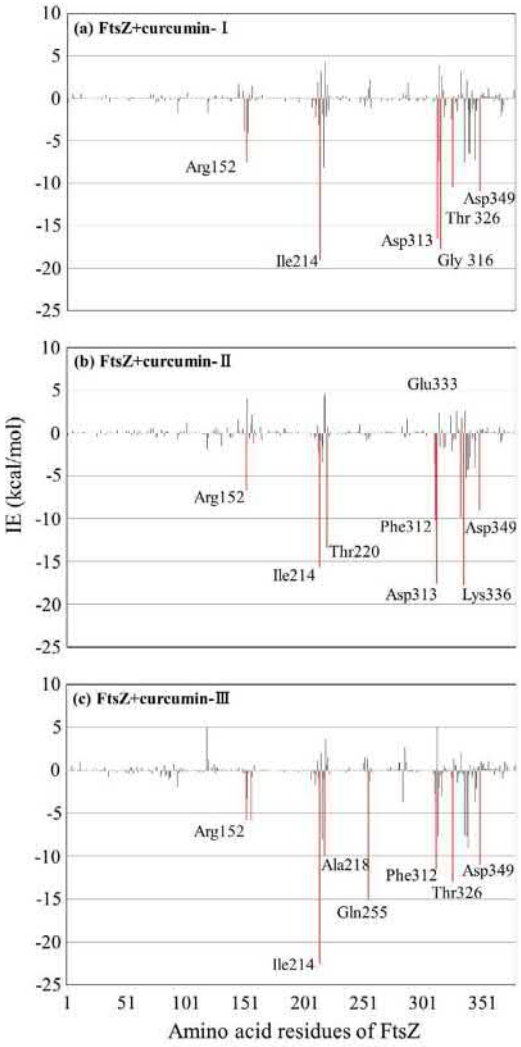


Fig. 4. Interaction energy (IE) between FtsZ residues and curcumin evaluated by *ab initio* FMO calculations; (a) curcumin-I, (b) curcumin-II and (c) curcumin-III.

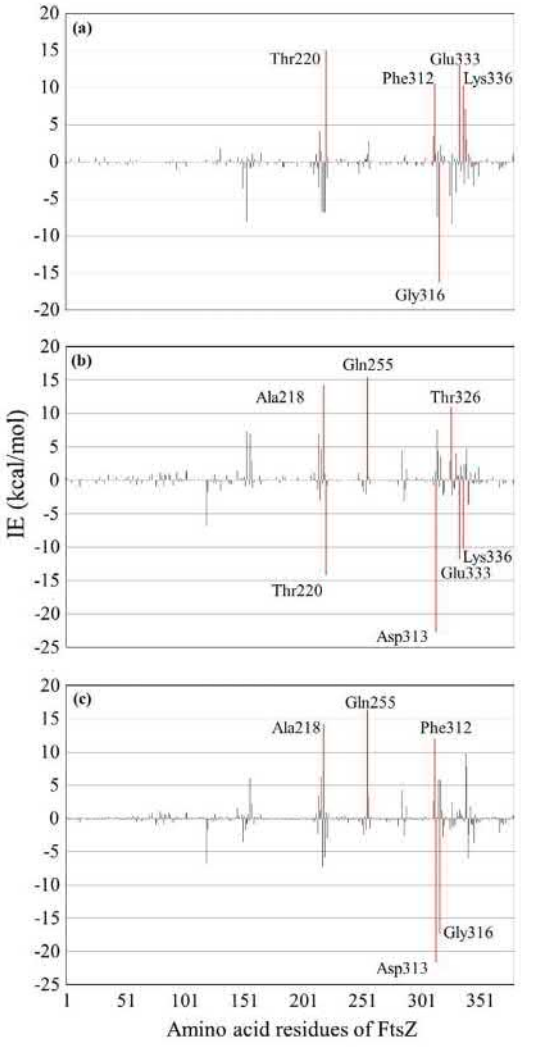


Fig. 5. Difference in interaction energy (IE) between FtsZ residues and curcumin; (a) between curcumin-I and curcumin-II, (b) curcumin-I and curcumin-III, (c) curcumin-II and curcumin-III.

Fig. S4(a), the central carbonyl groups of curcumin-I face the opposite direction of Gln255 and Phe312 residues and have no strong interaction with these residues. Curcumin-II (Fig. 1(b)) has no methoxy group at the 6-membered ring on the left side, so that this ring can rotate freely and one central carbonyl group of curcumin-II faces to Phe312 to form an electrostatic interaction with Phe312 at 3.6 Å distance, as shown in Fig. S4(b).

In contrast, since curcumin-III has no methoxy group at the both 6-membered rings of curcumin-I as shown in Fig. 1, the both rings can rotate more freely in the process of binding to FtsZ. By the influence of the rotation, the directions of the two carbonyl groups at the center of curcumin-III undergo a significant change as shown in Fig. 6(d) and S4(c). These groups form hydrogen bonds to Gln255 and Phe312 at 1.85 and 1.83 Å distance, respectively. In addition, the central methylene group directs to Ala218 and interacts electrostatically at 2.85 Å distance. As the result of these interactions, IEs between curcumin-III and Gln255, Phe312 and Ala218 residues are larger than those for curcumins I and II, as shown in Fig. 4(c). It can be concluded that these large IEs are the main reason why the BE between FtsZ and curcumin-III is 14 kcal/mol larger than those for curcumins I and II.

It is elucidated from the present molecular simulations that curcumins prefer to bind to the TZT-binding site of FtsZ as shown in Fig. 6, in which two hydroxy groups of the both 6-membered rings of curcumins form hydrogen bonds with some residues of FtsZ. Among three natural curcumins, curcumin-III has the largest BE with FtsZ, due to the hydrogen bonds between the central carbonyl groups of curcumin-III and Gln255 and Phe312 as indicated in Fig. 6(d) and S4(c). It is expected that the elimination of the methoxy groups at the both 6-membered rings of curcumin-I makes the rings more flexible, leading to the significant change in structure at the central part of curcumin-III. As a consequence, the central carbonyl groups of curcumin-III form hydrogen bonds with Gln255 and Phe312 residues of FtsZ. It is therefore expected that novel inhibitors against FtsZ are proposed by introducing some substitution groups into the central part of curcumin-III, in order to

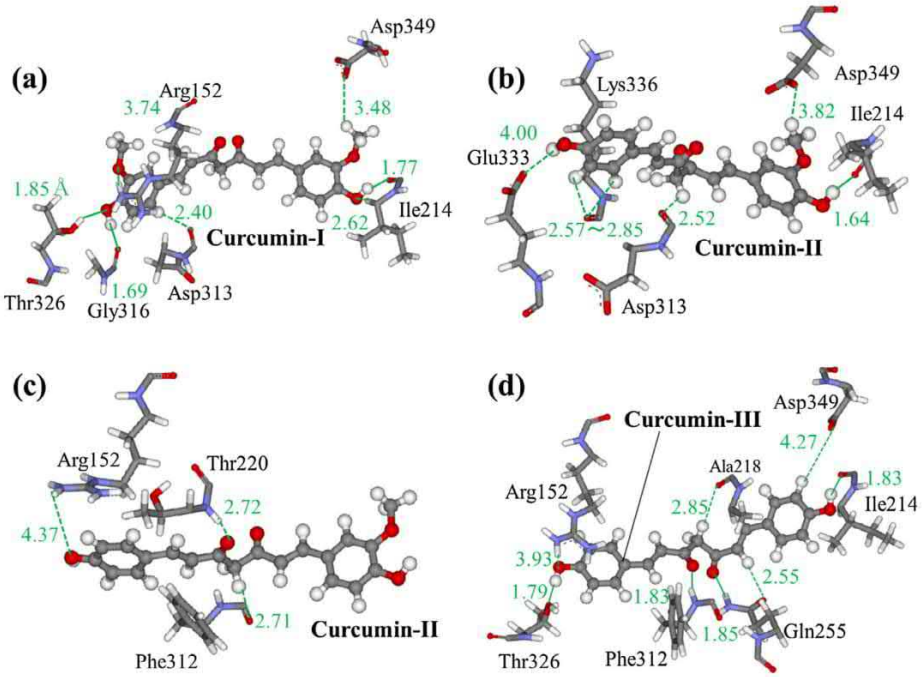


Fig. 6. Interacting structures between some FtsZ residues and curcumin; (a) FtsZ and curcumin-I, (b) and (c) FtsZ and curcumin-II, and (d) FtsZ and curcumin-III. Green solid lines and dashed lines indicate hydrogen-bonding and electrostatic interactions between the FtsZ residue and curcumin, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

strengthen the interactions between the central part and FtsZ residues around the TZT-binding site.

4. Conclusions

To propose potent inhibitors against FtsZ, we employed natural curcumins as a candidate compound and investigated their specific interactions with *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. By use of a protein-ligand docking simulation and classical MM optimization in water, the binding sites of curcumins were widely searched over the entire structure of FtsZ to produce many candidate structures for FtsZ+curcumin complexes. Furthermore, we investigated their electronic properties by *ab initio* FMO calculations and determined the most preferable structure at an electronic level to elucidate the following features on the interactions between FtsZ and curcumin.

(1) Curcumins prefer to bind the TZT-binding site of FtsZ.
(2) Arg152, Ile214, Ala218, Gln255, Phe312 and Asp349 residues of FtsZ contribute to the curcumin binding.
(3) Curcumin-III, which has no methoxy group at the 6-membered rings, can bind more strongly to FtsZ compared with curcumins I and II, due to the hydrogen bonds between the central carbonyl groups of curcumin-III and Gln255 and Phe312.

Acknowledgements

This study was supported by the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO), the student exchange program between the institute for food biotechnology and genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine and Toyohashi University of Technology, and the JSPS Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (No. 22650061) between Toyohashi University of Technology and the three institutes of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.12.045.

References

[1] P.A. Karpov, O.M. Demchuk, V.M. Britsun, D.I. Lytvyn, N.O. Pydiura, A.V. Rayevsky, D.A. Samofalova, S.I. Spivak, D.M. Volochnyuk, A.I. Yemets, Y.B. Blume, New imidazole inhibitors of mycobacterial FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in grid to *in vitro* verification, Sci. Innov. 12 (2016) 43–55.
[2] H. Tomioka, Prospects for the development of new antituberculous drugs putting our hopes on new drug targets, Kekkaku. 85 (2010) 815–822.
[3] D.N. Margalit, L. Romberg, R.B. Mets, A.M. Hebert, T.J. Mitchison, M.W. Kirschner, D.R. Chaudhuri, Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce bacterial lethality, PNAS. 101 (2004) 11821–11826.
[4] M. Osawa, H.P. Erickson, D.E. Anderson, Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes, Science 320 (2008) 792–794.
[5] K.R. Srinvasan, The colouring matter in turmeric, Curr. Sci. 21 (1952) 311–312.
[6] B.B. Aggarwal, H. Ichikawa, P. Garodia, P. Weerasinghe, G. Sethi, I.D. Bhatt, M.K. Pandey, S. Shishodia, M.G. Nair, From traditional ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer, Expert Opin. Ther. Targets. 10 (2006) 87–118.
[7] B. Ray, S. Bisht, A. Maitra, A. Maitra, D.K. Lahiri, 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. Alzheimer Dis. 23 (2011) 61–77.
[8] D. Rai, J.K. Singh, N. Roy, D. Panda, Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity, Biochemical J. 410 (2008) 147–155.
[9] A.K. Leung, E.L. White, L.J. Ross, R.C. Reynolds, J.A. Devito, D.W. Borhani, Structure of Mycobacterium tuberculosis FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches, J. Mol. Biol. 342 (2004) 953–970.

[10] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, Nature Protocols. 5 (2010) 725–738.
[11] A. Roy, J. Yang, Y. Zhang, COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation, Nucl. Acids Res. 40 (2012) 471–477.
[12] C.R. Søndergaard, M.H.M. Olsson, M. Rostkowski, J.H. Jensen, Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values, J. Chem. Theory Comp. 7 (2011) 2284–2295.
[13] M.H.M. Olsson, C.R. Søndergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, J. Chem. Theory Comp. 2 (2011) 525–537.
[14] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. calmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D.Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
[15] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[16] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman, AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
[17] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J.L. Klepeis, R.O. Dror, D.E. Shaw, Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, Protein 78 (2010) 1950–1958.
[18] W.L. jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, M.L. Klein, Compatison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[19] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[20] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayashi, Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 701–706.
[21] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, A parallelized integral-direct second-order Mφller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442–452.
[22] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.
[23] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Tagushi, S. Tanaka, Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. ACC. 130 (2011) 515–530.
[24] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, S. Tanaka, Intra- and inter-molecular interactions between cyclic-AMP receptor protein and DNA: *Ab initio* fragment molecular orbital study, J. Comp. Chem. 27 (2006) 948–960.
[25] A. Cormier, M. Marchand, R.B. Ravelli, M. Knossow, B. Gigant, Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands, EMBO Rep. 9 (2008) 1101–1106.
[26] T. Matsui, J. Yamane, N. Mogi, H. Yamaguchi, H. Takemoto, M. Yao, I. Tanaka, Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from Staphylococcus aureus, Acta. Cryst. D68 (2012) 1175–1188.

5.3 Взаємодія куркуміну з сайтами рестрикції АβРР

Advances in Biochemistry
2016; 4(4): 34-46
http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ab
doi: 10.11648/j.ab.20160404.11
ISSN: 2329-0870 (Print); ISSN: 2329-0862 (Online)

Anti-Cytokine Activity of Curcumin and Its Binding to a Fragment of AβPP

Victoria V. Sokolik[1], Pavel A. Karpov[2], Dariya A. Samofalova[2], Sergiy M. Shulga[2, *]

[1]Laboratory of Neurophysiology, Immunology and Biochemistry, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology Natinal Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

[2]Department of Industrial and Food Biotechnology, Institute for Food Biotechnology and Genomics National Academy of Sciences of Ukrainea, Kiev, Ukraine

Email address:
Shulga5@i.ua (S. M. Shulga)

*Corresponding author

To cite this article:
Victoria V. Sokolik, Pavel A. Karpov, Dariya A. Samofalova, Sergiy M. Shulga. Anti-Cytokine Activity of Curcumin and Its Binding to a Fragment of AβPP. *Advances in Biochemistry.* Vol. 4, No. 4, 2016, pp. 34-46. doi: 10.11648/j.ab.20160404.11

Received: May 19, 2016; **Accepted**: June 2, 2016; **Published**: June 20, 2016

Abstract: Since it has been shown that Alzheimer's disease is accompanied by higher peripheral concentrations of cytokines, we focused on the correction of chronic inflammation causing Aβ excess and aggregation what should have a positive impact. Proinflammatory cytokines action is realized by NF-κB intracellular signals. Curcumin can inhibit activation of the proinflammatory transcription factor NF-κB and is able to be mounted in the amyloid-β fibrils and encourage their disaggregation. To study the influence of anti-inflammatory effect of curcumin and its ability to model complexes with a fragment of AβPP. Investigation was carried out on rats with model of Alzheimer's disease using nasal therapy with curcumin Concentration of cytokines in cerebral cortex, hippocampus and blood serum, and indicators of conditioned active escape reflex were determined in this study. Methods of molecular dynamics and docking were used to examine the interactions of curcumin with fragment of AβPP. Aβ42_Human in the hippocampus of rats provoked chronic neuroinflammation specifically and primarily at the injection site. Curcumin performance revealed specific depressing effect on cytokines in the cerebral cortex and in the hippocampus it appeared similar to the above, but of lower level. Anti-inflammatory activity of curcumin led to the recovery of memory parameters. Analysis of restriction sites of AβPP has shown that position of curcumin in Site II is energetically more favorable for binding. Our suggestion that curcumin is an effective anti-cytokine factor was confirmed by experimental results obtained *in vivo* and explain the mechanism describing its effect on NF-κB Curcumin doesn't block the excision Aβ but binding with its hydrophobic region.

Keywords: Alzheimer's Disease, Curcumin, Amyloid-β, Cytokine, Rat, Docking

1. Introduction

Recently, aggregation of amyloid-β (Aβ) to form fibrils or depositions is considered to be one of the belivable factors of the pathology of Alzheimer's disease (AD), being the major pathogenetic event [1-4]. In particular, several studies have shown that Aβ accumulates abundantly in certain brain areas namely, hippocampus and cerebral cortex which subserve information acquisition and processing, and memory [5-7]. This peptide is formed within the amyloyidogenic processing of the amyloid-β protein precursor (AβPP) [8-10].

Alternatively, processing within the non-amyloidogenic pathway involves full-length AβPP cleaved by α- and γ-secretases in the trans-Golgi network apparatus and plasma membrane, precluding amyloid-β formation (or amyloidogenesis). The inverse internalization of certain AβPP parts of the plasma membrane and their transport to late endosomes leads to Aβ isoforms excision, which have 38-43 amino acid residues in length, caused by β- and γ-secretases cleavage [11]. A variety of factors is believed to play a role of switch between non-amyloidogenic and amyloidogenic AβPP processing pathways, such as AβPP excess, degree of its phosphorylation, receptor SORL1 expression intensity, the presence of mutations in AβPP and

presenilins [12-16].

Endogenous Aβ is a critical player in the synaptic plasticity and memory in normal central nervous system [17-19]. It has been proposed that at low (picomolar) Aβ concentrations could act as the trophic signal and modulator of synaptic activity, with implications in memory and learning [20-22]. Furthermore, Aβ could work as antioxidant, due to its ability to capture redox metals, such as Cu, Fe and Zn, and, thus, prevent their participation in redox cycles with other ligands; hence Aβ has the ability to function as a chelator and antioxidant molecule [23-25]. Amyloid-β may be vital for the development of neurons, their plasticity and survival due to its integral membrane interactions, in maintaining the structural integrity of the blood brain barrier (BBB); it has antimicrobial properties and modulates intracellular Ca^{2+} transporting evoked by cholinergic receptors [26-30].

At high concentrations of Aβ (nanomolar to micromolar), neurotoxic aggregates are formed: oligomers or fibrils, resulting in amyloidosis and cell death [31-33]. The mechanism by which amyloid-β can cause neurons damage and death is reactive oxygen species generating during its self-aggregation process. At the same time lipid peroxidation is activated on neuron membranes and functions of ion-motive ATPases (glucose and glutamate transporters) are impaired http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamate_transporters. As a result Aβ promotes depolarization of the synaptic membrane, excessive calcium influx and mitochondrial impairment [34-36]. These processes are accompanied by non-specific inflammatory reaction, which becomes chronic, and induce the synthesis of AβPP and its processing by amyloyidogenic script [37-39].

Existing therapeutic approaches to the treatment of amyloidosis in Alzheimer's disease focused on reducing the production and aggregation of amyloid-β [40-42] or symptomic therapy are ineffective [43-47].

Since has previously been shown that AD is accompanied by an inflammatory response, particularly higher peripheral concentrations of cytokines (IL-6, TNFα, IL-1β and other) and higher CSF concentrations of TGF-β [39], we focused on the correction of chronic inflammation that triggers Aβ excess and aggregation and should have a positive impact. Proinflammatory cytokines, namely IL-1β and TNFα, IL-6 is ambivalent and IL-10 (anti-inflammatory), in a line with Aβ, are mediators of innate immunity [48, 28]. Their action is realized through receptor activation of intracellular signals leading to translocation of NF-κB in the nucleus and activation of protein synthesis *de novo* [49-50]. However, the existing anticytokine therapy is not proven, with exception of the anti-inflammatory IL-10 [51-52].

Curcumin (CUA) has been shown to regulate negatively transcription factors NF-κB, AP-1; to suppress the expression of cyclooxygenase-2, lipoxygenase, NO synthase, matrix metalloproteinase-9, urokinase-type plasminogen activator, TNF, chemokines, cell surface adhesion molecules and cyclin D1; to inhibit the expression of growth factor receptors and activity of JNK, protein tyrosinekinases, and several other protein serine/threonine kinases [53-56]. This natural polyphenol is nowadays well described as an inhibitor of DNA methyltransferase so that it is considered as a DNA hypomethylating agent. It reestablishes the balance between histone acetyl transferase and histone deacetylase (HDAC 1, 3, 4, 5, 8) activity to selectively activate or inactivate the expression of genes. Finally, curcumin modulates the activity of miRNAs (miR-15a, miR-16, miR-21, miR-22, miR-26, miR-101, miR-146, miR-200, miR-203, and let-7) and their multiple target genes [57].

It was found that CUA is able to be mounted in the fibrils amyloid-β and encourage their disaggregation by forming a salt bridge with amino acid residues of the polypeptide chain, namely, Asp23 and Lys28, competing thus with metal ions Zn^{2+} or Cu^{2+} [58]. However, the probability interaction of CUA with sites of AβPP cleavage by relevant secretases is of great interest [59].

The purpose of the research was to study the influence of anti-inflammatory effect of curcumin and modeling of its complexation with a fragment of AβPP (Fragment_63Rat) that containing Aβ.

2. Materials and Methods

2.1. Design of Research

Investigation was carryed out on 30 white mature male Wistar rats six-month age weighting 200-250 g. All animals were maintained with a controlled 12-h light-dark cycle and standard rodent chow and tap water. The experimental protocols were performed in accordance with General ethical principles of animal experiments (Kiev, 2011), European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and the internationally recognized principles for the use and care of laboratory animals, asstated in the US guidelines [60].

The rats were divided into 5 groups at random (n = 6 in each group). The Control group included of intact animals with conditioned active escape reflex, but without any effects. Main group 1 includes rats 1 month after intracerebral introduction Aβ42_Human to hippocampus (AD animal model); Comparison group 1 - false-acts animals; Main group 2 - rats with AD experimental model, which obtained nasal therapy with an aqueous CUA solution during 1 month daily and Comparison group 2 - animal with AD animal model, which obtained nasal therapy with diluent (bidistilled water) during 1 month.

2.2. Cognitive and Memory Tests

Previously 20 days before, a conditional active escape reflex was formed in all rats based on the unconditional reflex. In a cage, which is equipped with a window wall, a conditional signal was performed to the animals (metronome sound with a frequency of 300 beats per minute). A rat had to cross through a window to the part of the cage for 15

seconds. If the conditioned active escape reflex was conditional reflex escaper's action absent the unconditional signal was performed to the animal (electric current on a metal grid floor of the cage with a voltage of 30-40 for 10 seconds). The conditional signal was performed to each rat five times a day with pauses 1-3 seconds every day. The positive result was considered conditional reflex answers to metronome sound without mistakes. In animals as quantitative indicators of cognitive ability and memory have registered of the part of positive reactions (in percent) and the duration of latency periods of conditional reflex answers in seconds [61]. The duration of latency period was determined with stopwatch beginning from the metronome start until the rat moved in the other part of the cage.

These indicators of conditioned active escape reflex tested animals of all groups after animal model of AD formation and curcumin therapy, respectively.

2.3. Alzheimer's Disease Animal Model and Curcumin Therapy

Effects of Aβ42_Human in homoaggregate form was studied after 1 month after a single administration at a dose of 15 nM Aβ42_Human (65 μg) to hippocampus of rats. The volume of the solution was 10 µl per animal. Aβ42 was delivered to the hippocampus in stereotaxic installation using chromatographic syringe at a rate of 0.03 µl per second for 5 min.

Aβ42_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich) dissolved in bidistilled water was aggregated for 24 hours at 37°C. Large, coarse conglomerates Aβ42_Human dispersed by ultrasound and sterilized immediately before introduction.

Stereotactic coordinates of the left hippocampus were determined according by the map of the brain by J. Bures [62], which corresponds to the distance from the point of intersection of the sagittal suture with bregma (zero point): distal - 2 mm, lateral - 2 mm and in depth - 3.5 mm. Stereotactic operation were carried out on rats under the general anesthesia by means of intraperitoneal injections of thiopental, 50 mg/kg body weight.

Since curcumin is poorly soluble in water, concentrated stock curcumin solution was originally prepared in 96% ethanol. CUA remained stable in ethanol at room temperature for several weeks, but degraded in water at neutral or mildly basic pH [63]. Therefore, CUA stock solution was freshly diluted daily to 0, 7 g/l in bidistiller water (the ratio alcohol: water in the working solution of curcumin was 1:100) immediately before every nasal administration to rats using a disposable pipette at a dose of 3, 5 μg per animal.

The animals were decapitated after treatment and their brain and blood were obtained quickly. Hemispheres were dissected and interesting regions (hippocampus and cerebral cortex) were removed, frozen and stored until ELISA analysis of cytokines. Blood was collected and centrifuged at 1000×g for 20 minutes. Serum was collected, frozen and stored until cytokine tested. The hippocampal and cerebral cortex tissues were homogenized in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged at 14,000×g for 5 minutes and collected supernatant.

2.4. Cytokine Quantification Perfomed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Samples of hippocampal and cerebral cortex supernatant and blood serum were processed to quantitively measure the amount of cytokine ELISA method in accordance with the manufacturer's instructions Rat ELISA Kits Invitrogen BCM DIAGNOSTICS, USA for interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-α (TNFα). OD was read by microplate analyzer GBG Stat FAX 2100 (USA) at 450 nm with the wavelength correction at 630 nm [64]. ELISA assay data (µg/l cytokine) were normalized to g total protein or expressed at ng/l of blood serum. On figures, were the obtained indexes are presented as a percent from Control indexes. Total protein content was determined by Lowry [65].

2.5. Molecular Dynamics (MD) Simulations and Protein Ligand Docking

To simulate the interactions of curcumin with AβPP-fragment Fragment_63Rat - A4_RAT (P08592: Ile661-Leu720) of 63 amino acid residues, containing amyloid-β and the three restriction site for β-, α- and γ-secretase, was selected. Because of the lack of experimentally obtained protein structures, homology modeling was impossible. Therefore, we performed a preliminary parameterization and analysis of hypothetical spatial organization using protein secondary structure prediction servers: ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) and SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/) for modeling using several templates and *de novo* methods [66-67].

3D-models of Fragment_63Rat were built using I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) and SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org) profile modeling servers, QUARK *de novo* modeling tool (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/), and original algorithm of *de novo* mathematical modeling tool Molecular Constructor [68]. Optimization of built models geometry and verification of folding were performed using a full-atomic force field CHARMM [69] and software package GROMACS 4.5 [70]. Checking of models stability was based on root-mean-square deviation between C-atoms (RMSD) and total conformational energy - CE (the energies of van der Waals and Coulomb interactions) [71].

To evaluate curcumin as potential inhibitor of enzymatic restriction, we used flexible molecular docking in CCDC GOLD Suite 5.1. Parameterization of molecular target (Fragment_63Rat), ligand (curcumin) and conditions of docking were performed according to CCDC recommendations, with the maximum docking site: maximum radius from selected atom. Evaluation of the docking, potential affinity of ligand and binding site was performed basing on evaluation functions of CCDC GOLD (http://www.ccdc.cam.ac.uk): GoldScore and ASP [72].

Visualization and analysis of molecular modeling and docking results were performed in PyMOL [73] and BIOVIA DS Visualizer (http://accelrys.com/).

2.6. Statistical Analysis

The results were treated statistically; the average values and standard deviations were calculated. Statistical analysis of differences was performed using Student's t-test for the corresponding Main and Comparison groups, and among Control indexes. The value of $p<0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Cytokines Changes in Chronic Neuroinflammation Induced Homoaggregates of β-Amyloid Peptide 42_Human (AD Animal Model) in Rats

Expressive changes in the content of IL-1β, TNFα, IL-6 and IL-10 in blood serum of the animals with AD animal model (Main group 1) was not revealed comparing with the Control group. As shown in Table 1, only serum concentrations of TNFα increased by 20% and IL-10 declined by 54%, respectively. Similar trends were noted in the Comparison group 1 (false-acts animals). Thus, cytokine levels in blood serum doesn't reflect the specific action of Aβ42_Human in the brain, but the result intracerebral intervention.

Table 1. *Action of Aβ42_Human of homoaggregate and curcumin on IL-1β, TNFα, IL-6 and IL-10 in blood serum of examine rats.*

Cytokine	Control group (ng/l)	Main group 1 (ng/l)	Comparison group 1 (ng/l)	Main group 2 (ng/l)	Comparison group 2 (ng/l)
IL-1β	17.2±1.2	16.8±1.1	15.7±0.6	20.9±2.3 *#&	16.2±1.2
TNFα	7.9±0.8	9.5±0.6 *	10.7±1.0 *	10.3±1.4 *#	13.0±1.2 *&
IL-6	4.8±1.0	3.7±0.6	5.3±1.1	1.8±0.5 *&	1.8±0.3 *&
IL-10	3.9±0.4	1.8±0.2 *	1.3±0.2 *#	4.0±0.5 #&	1.6±0.2 *

The results given as the mean value ± S. D.
* - p≤0.05 in comparison with Control; # - p≤0.05 among suitable Comparison group; & - p≤0.05 in comparison with Main group 1 (AD animal model)

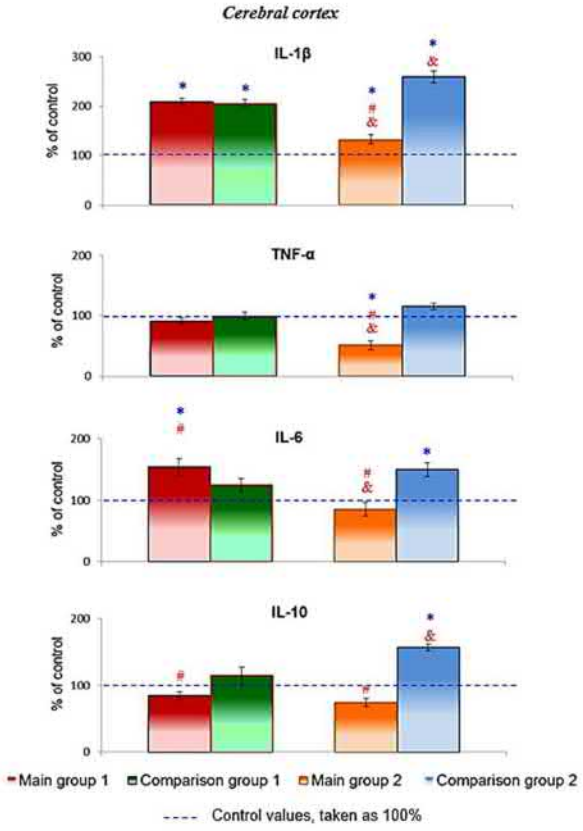


Figure 1. *Effect of Aβ42_Human and CUA therapy on levels of cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in the cerebral cortex of brain rats. The results are expressed in % of Control, and given as the mean value ± S. D. * - p≤0.05 compared to Control; # - p≤0.05 among suitable Comparison group; & - p≤0.05 compared to Main group 1 (AD animal model).*

The study of cytokines in the cerebral cortex of the rats with AD animal model (Main group 1) showed a low-grade inflammatory response, namely increase in level of IL-6 by 29% and reduce of IL-10 by 31%, comparing to the concentrations in false-acts animals (Fig. 1). Significant increase in level of IL-1β by 109% of the rats with AD animal model compared with those of Control group corresponds to level of this cytokine in Comparison group 1 (105%). This could come from injection itself. The content of TNFα in the cerebral cortex and hippocampus of rats of Main group 1 and Comparison group 1 did not differ from Control index and among themselves.

Hippocampal levels of IL-1β and IL-10 in rats with AD animal model increased significantly, compared with those in Control (by 221% and 111%) and Comparison 1 (by 110% and 78%) groups. In this brain part, concentration of IL-6 rats of the Main group 1 did not differ from values in intact animals, but was reduced by 44% against IL-6 concentration in false-acts rats (Fig. 2). These data suggest that homoaggregates of Aβ42_Human in the hippocampus of AD animal model rats provoked chronic neuroinflammation specifically and primarily at this region of the brain. However, in the cerebral cortex of these rats activation of inflammation reaction was also featured, albeit to a lesser extent. This result confirms our previous research, in which it was shown that homoaggregates of Aβ40_Human introduction into the cerebral cortex of rats causes more cytokine response in that part of the brain of rats in comparison with the situation in hippocampus [74].

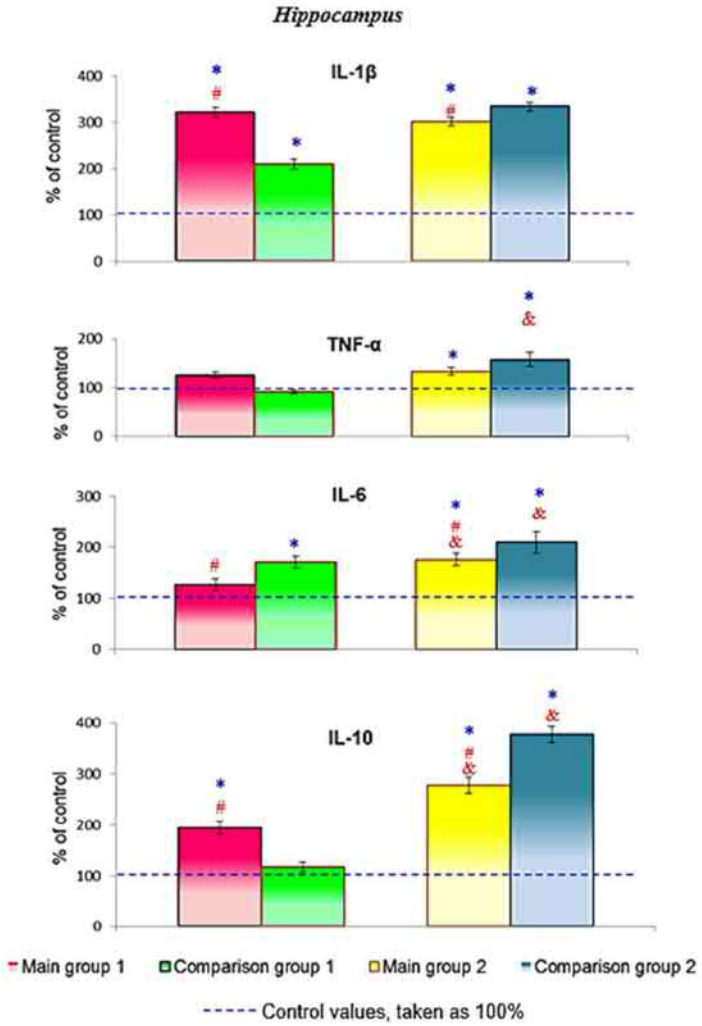


Figure 2. *Effect of Aβ42_Human and CUA therapy on levels of cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in the hippocampus of brain rats. The results are expressed in % of Control, and given as the mean value ± S. D. * - p≤0.05 compared to Control; # - p≤0.05 among suitable Comparison group; & - p≤0.05 compared to Main group 1 (AD animal model).*

Intrahippocampal introduction of Aβ42_Human homoaggregate caused inhibition of conditional active escape reflex in rats of Main group 1. The study of cognitive capabilities and memory revealed reduction of the proportion of positive reactions and increase of latent period in these animals among rats of Control group (Fig. 3). However, the part of positive reactions with AD animal model rats did not differ from the index of false-acts animals, describing the effect of intracerebral interventions.

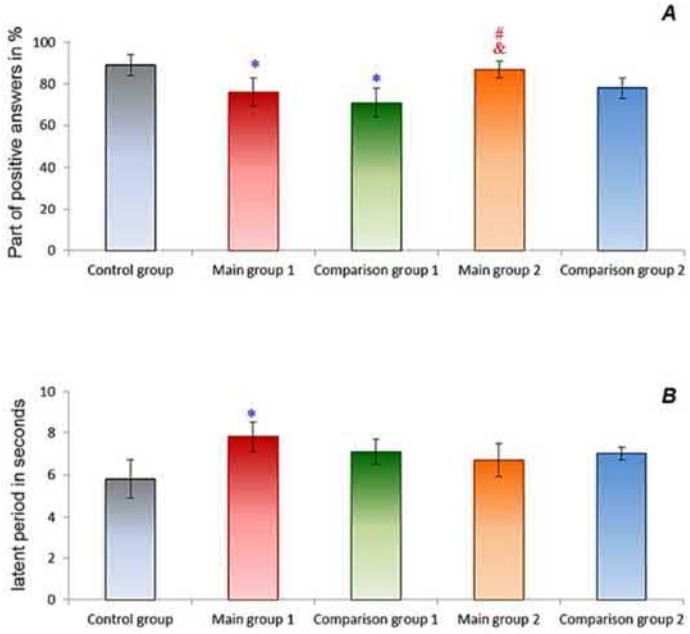


Figure 3. *Changes of part of positive reactions (A) and latent periods (B) by the action Aβ42_Human and CUA therapy in rats. The results given as the mean value ± S. D. * - p≤0.05 compared to Control; # - p≤0.05 among suitable Comparison group; & - p≤0.05 compared to Main group 1 (AD animal model).*

3.2. Effect of Curcumin on the Concentration of IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 in Rats with AD Animal Model

Daily CUA therapy of rats with AD-model for 1 month led to increase of levels of proinflammatory cytokines: IL-1β (by 22%) and TNFα (by 30%) and reducing of ambivalent IL-6 (by 38%) in blood serum compared of Control (Table 1).

In the Comparison group 2 (nasal administration of bidistillate instead of CUA solution to rats with AD animal model) content of IL-1β remained unchanged, but dynamic concentrations of TNFα and IL-6 coincided with the Main group 2. However, CUA renewed quite specifically concentration of anti-inflammatory IL-10 in serum of rats in contrast to the effect of bidistilled water. In general, cytokine response in blood circulation of experimental rats is activated by curcumin treatment.

Curcumin performance in the cerebral cortex revealed specific depressing effect on cytokines (Fig. 1). Namely, the normalized level of IL-1β and IL-6; TNFα reduced by 49% compared to Controls; IL-10 level did not change, but at the same time it did not differ from control indexes. The further aggravation of neuroinflammation induced by intrahippocampal injection of Aβ42_Human was observed in Comparison group 2, the concentrations of IL-1β and IL-10 in this area of the brain increased by 50% and 73%, respectively, after 1 month of bidistillate treatment, what corresponds to 2-month term impact of Aβ42_Human compared with Main group 1.

In the hippocampus of animals, CUA effect on cytokine appeared similar to the above, but below the level (Fig. 2). The cytokines concentration did not normalize, while level of IL-6 and IL-10 increased by 49% and 83% respectivly, compared with the indexes month ago (Main group 1). But when comparing hippocampus cytokines of Main groups 2 rats of Comparison groups 2 becomes clear specific CUA induced inhibition levels of IL-1β (by 33%), TNFα (by 24%), IL-6 (by 34%) and IL-10 (by 99%). The observed anti-inflammatory activity of CUA led to the recovery of memory parameters, in particular concerning positive reactions of animals (Fig. 3).

3.3. Fragment_63Rat Docking with Curcumin

During experiments on prediction of the spatial structure of Fragment_63Rat (Ile661-Leu723 of APP) we have selected 8 models: one built by a server profile simulations SWISS-MODEL (63_SM), 1 built de novo using the tool conformational search QUARK (63_Q), 5 models were built using I-TASSER server (63_IT1-5) and 1 model was reconstructed using original de novo mathematical modeling tool - Molecular Constructor (63_MC).

Analysis of the physicochemical properties of built models using ProtParam tool provided us with information necessary for further parameterization of input files for molecular dynamics in Gromacs. Short-term molecular dynamics was carried out using explicit solvent in the box. Its size was oversized (10 Å) because of high mobility and the lack of information on conformational mobility of Fragment_63Rat. Geometry optimization via free energy minimization was performed using computational modules «grompp», «mdrun», ffgmx force field, and Steepest Descent Algorithm (maximum number of steps = 1000 and gradient = 0.1). Molecular dynamics simulations (5 ns at T = 310°K) were performed using full atomic force field.

There were no messages about incorrect or invalid values of conformational parameters during the calculation of Fragment_63Rat molecular dynamics. What in part demonstrates the high quality and stability of constructed models [75-76]. Results of molecular dynamics were analyzed taking into account two criteria: standard deviation between C-α-atoms (conformational fluctuations, RMSD) and protein conformational energy (total energy of van der Waals and Coulomb interactions, CE), using previously proven protocol (Fig. 4) [75, 77].

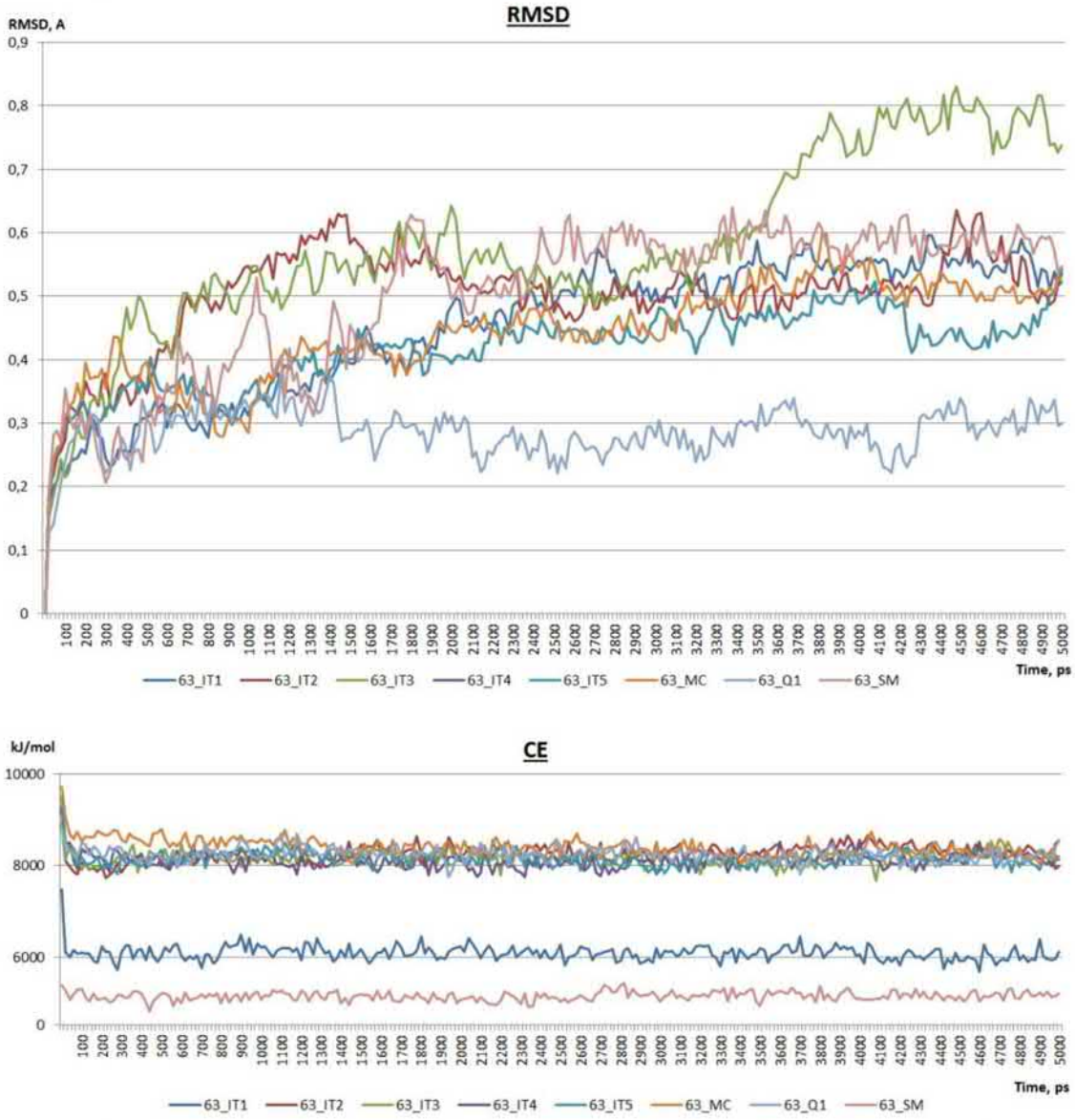


Figure 4. *Standard deviation between Cα-atoms (RMSD) and conformational energy (CE) of built models of Fragment_63Rat according to results of molecular dynamics simulations.*

High conformational mobility of some models during MD simulations is potentially associated with a large amount of unstructured elements. Despite high fluctuations of 63_IT3 and highest stability of 63_Q, their energy fluctuations are well correlated with all models except for 63_SM and 63_IT5. Subsequent analysis was performed for average normal energy models (t = 4-5 ns) using internal tools of Gromacs. Based on results of molecular dynamics, for docking with a molecule of curcumin, two models of target protein were selected (Fig. 5): 63_Q - a model with best performance and energy of conformational fluctuations, and 63_IT3 - a model, characterized by the presence of unique elements of secondary structure, inherent in this group of proteins [78]. Preliminary we have selected three sites of enzymatic restriction of Fragment_63Rat: I - Met11-Asp12 (for β-secretase); II - Lys27-Leu28 (for α-secretase); III - Val51-Ile52 (for γ-secretase).

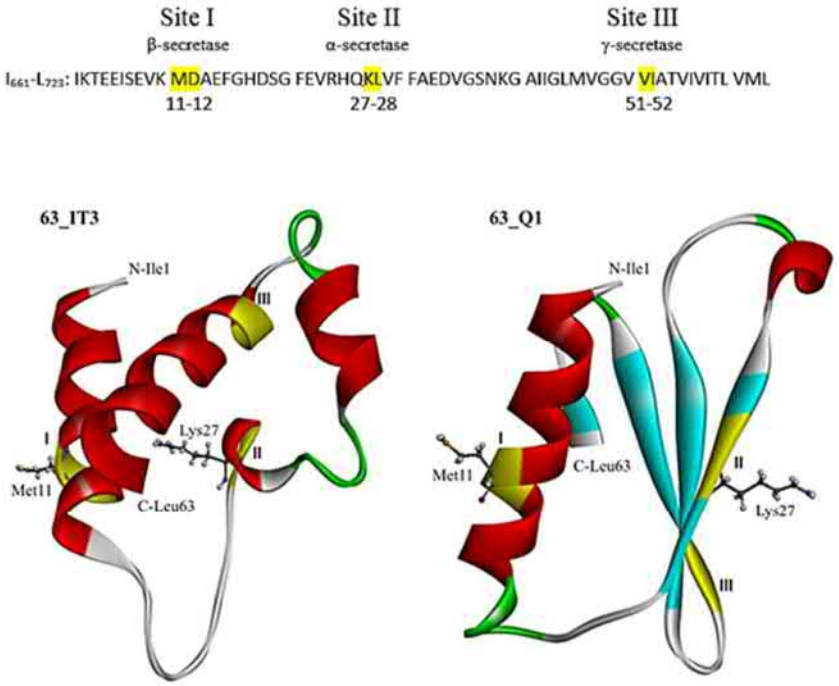


Figure 5. *A ribbon diagrams of the spatial structure models of rat fragment 63 reconstructed by profile (63_IT, I-TASSER server) and de novo (63_Q1, service QUARK server) methods.*

Note: Yellow color shows possible sites of enzymatic restriction - (I) Met11-Asp12 (β-secretase); II - Lys27-Leu28 (α-secretase); III - Val51-Ile52 (γ-secretase).

It was found that according to constructed model, site III located on unstructured and moveable part of peptide (Fragment_63Rat) preventing binding of CUA at this area. At the same time, Site I and Site II definitely have more favorable structure for binding such structures and were selected for subsequent molecular docking. As ligands, we used two conformations of CUA: 1) extracted from PDB-structure of TTR (PDB: 4PMF) and 2) chosen according results of conformational search. After checking accuracy of atoms and bonds, ligands were saved in full atomic format *. mol2, and prepared for docking using Hermes program by CCDC Software Ltd. Analysis of 63_IT3 and 63_Q sites of CUA binding was performed using a flexible molecular docking using CCDC GOLD genetic algorithm. Default settings of CCDC GOLD were used, except choice of site central atom and radius of docking region. In this case, choice of sites was caused by location of two amino acid residues - experimentally predicted sites of enzymatic restriction. In the case of the first site (Site I), centering was made on Met11, and CA of model 63_IT3 and CB of model 63_Q1 were used as central atoms of target. In the case of the second site (Site II), centering was carried out on Lys27, and CA of model 63_IT3 and CB of model 63_Q1 were used as central atoms of target. For docking, a complete mobility of the ligands was set. Amino acid residues of target were fixed, and the radius of docking site was increased up to 15 Å, covering the major part of model surface. In the first case, genetic algorithm was run in 100 time repetition, and in the second case, it was run in 10 times based on 10-best frames selected in the first stage. Internal evaluation functions of CCDC GOLD were used as selection criteria. Thus, the value of key function - GoldScore indicate affinity of ligand to binding site (higher value - better), and ASP value indicates comfort of conformational state of the ligand itself (smaller

value - better). Coincidence of favorable values of GoldScore and ASP was a marker for selection of leading models of curcumin-Fragment_63Rat interaction. According to aforementioned algorithm, we found coincidence of two conformational states of curcumin in complexes with 63_Q and 63_IT3. These conformations were selected based on statistical indicators of CCDC GOLD, and advantageous conformational states of selected ligands. In the leading models of curcumin-Fragment_63Rat complexes (Fig. 6) methyl group of CUA are placed within a hydrophobic pocket of the target, and oxygen groups form stable hydrogen bonds. We consider that conformation of the model 63_Q is more probable for curcumin binding, due to presence of conformationally stabile elements of secondary structure, results of statistic and molecular dynamics. SOPMA method of secondary structure prediction, with a probability of 73% makes it possible to establish the main elements of primary structure of polypeptide chain: α-helix, β-fold, β-turns and irregular structure areas. Comparative analysis of Site I and Site II based on the ChemScore evaluation algorithm of CCDC GOLD has shown that position of curcumin in Site II is not only conformationally, but also energetically more favorable for ligand binding.

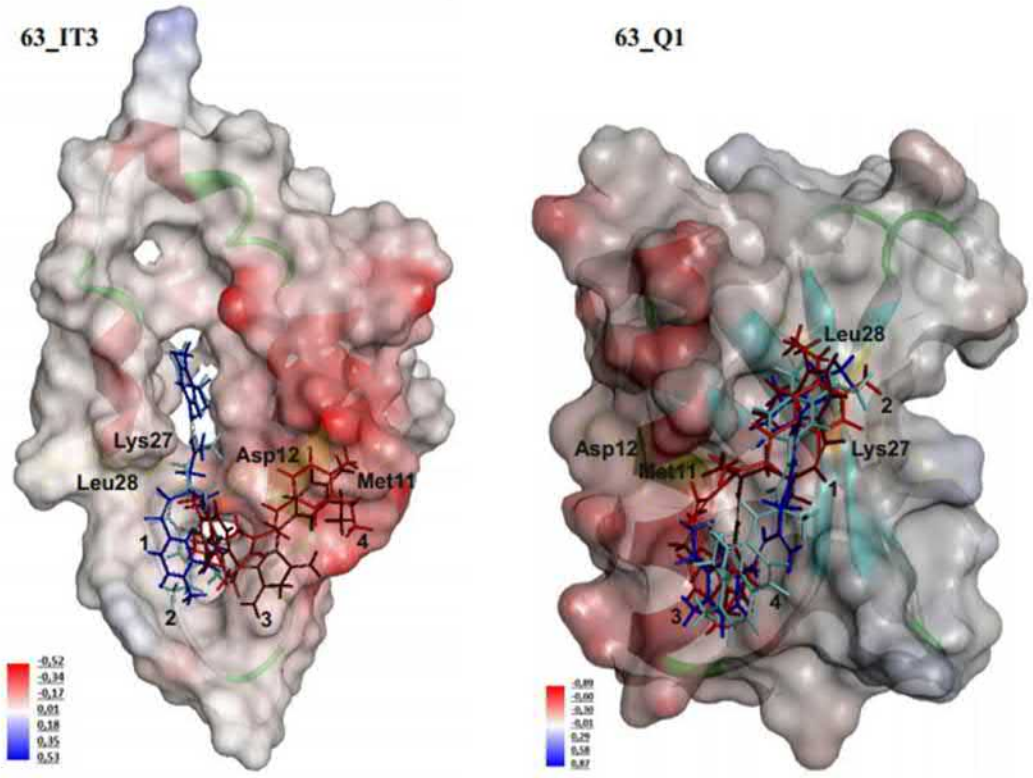


Figure 6. *Structure models of curcumin-Fragment_63Rat complex.*

Site I (Met11-Asp12): 1) using conformation of curcumin extracted from PDB-structure of TTR (PDB: 4PMF), 2) using conformer of curcumin, selected based on conformational search;
Site II (Lys27- Leu28): 3) using conformation of curcumin extracted from PDB-structure of TTR (PDB: 4PMF), 4) using conformer of curcumin, selected based on conformational search.

Our results indicate, that suppose of the possible interaction of curcumin with aforementioned sites (Site I for β-secretase and Site II for α-secretase) of enzymatic restriction has a right to exist.

4. Discussion

Ours results demonstrated activation of cytokines system in rat's brain with AD animal model (Fig. 1-2). These data confirms numerous researches about neuroinflammation induced by Aβ deposits, fibriles or oligomers [79-84]. Aβ deposition is responsible for microglia activation [79]. Aβ enhances the inflammatory response to stimulation of NF-κB, nuclear factor that is involved in the regulation of ERK (extracellular signal-regulated kinase) and MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathways that lead to the production of cytokines and chemokines [80]. Toll-like receptors (TLR), along with IL-1R and TNFR, are important for regulation of microglial responses to Aβ. Modification of the inflammatory state of microglia/macrophages may play an axial role in AD-

related pathology [81]. According to our data, chronic neuroinflammation induced by the administration of Aβ42_Human to hippocampus manifested changes of TNFα and IL-10 serum levels (Table 1) and decline in cognitive and memory indexes in rats (Fig. 3). Therefore, hyperproduction of cytokines may play a role of realizing mechanism in the early stages of amyloidosis and Alzheimer's dementia.

Our suggestion that curcumin is an effective anti-inflammatory factor was confirmed by experimental results obtained *in vivo* and explain the mechanism described its effect on NF-κB. It is known, that CUA can inhibit activation of the proinflammatory transcription factor NF-κB, inhibiting phosphorylation and degradation of IκBα, an inhibitor of NF-κB. CUA is also a potent inhibitor of COP9 signalosome and associated kinases, casein kinase 2 and protein kinase D, all linked to the ubiquitin-proteasomal system (UPS) [85-86]. Effect of curcumin is inhibition of IB kinase (IKK) activation, required for NF-κB activation [87-89]. That is what we explain the detected anticytokine effect curcumin in experimental animals (Fig. 1-2).

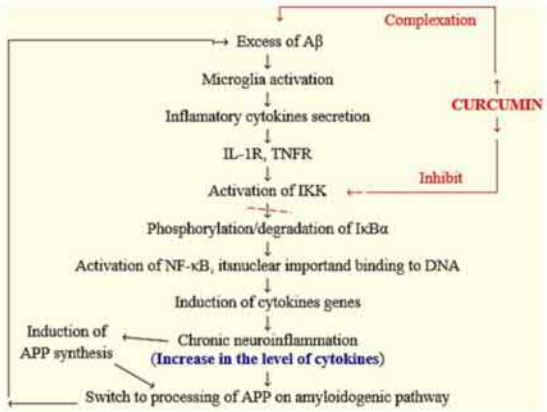


Figure 7. *Hypotetical scheme of anticytokine activity of curcumin in Aβ-indused animals and its binding to a fragment of AβPP.*

Hypotetical scheme of Aβ42_Human and curcumin influences through intersection point of cytokines signaling to the NF-κB pathway is shown in Fig. 7.

It has been shown that CUA inhibits the formation of Aβ fibrils and has potential anti-amyloidogenic effect [90-93]. Similarly, nanoparticles functionalized with CUA derivatives [94] exhibit high affinity toward Aβ42 monomers and the corresponding fibrils [95, 96]. Recent studies of the complex Aβ42 curcumin analysis of MD trajectories showed that the C-terminal β-strands at the site Ala21-Val40 are much rarer spirals and curcumin helps to stabilize the latter. In addition, calculations Aβ42-CUA complex showed its direct interaction with the hydrophobic cor Aβ42, which may explain why curcumin acts as an inhibitor of aggregation of Aβ42 [97, 98]. They are hydrophobic residues Phe 10, Phe 19, Phe 20 and Leu34, which do not belong to the sites of the proteolytic clevage of AβPP and are in their neighborhood, interacting with the hydrophobic region of the phenolic rings of curcumin. These data are consistent with those obtained in our work to sites I and II: in particular, all three phenylalanine surround processing site II of AβPP, while Phe10 and Leu34 are closer to sites I and III, respectively, (Figure 6). Therefore, anti-amyloidogenic effect of curcumin is not blocking the excision sites Aβ40 or Aβ42 but a binding of the hydrophobic region in beta-amyloid peptide and aggregation preventing. Thus, some levels of curcumin effect have been shown in experiments *in vivo* and *in silico* (Fig. 7), its anti-amyloidogenic influence is realized.

5. Conclusions

The role of neuroinflammation as a mechanism of cognitive impairments development has been shown by the experimental model of Alzheimer's disease in rats. An anti-inflammatory effect of nasal treatment with an aqueous solution of curcumin has been determined. A scheme of curcumin action has been proposed taking into account the data of molecular docking with the АвPP fragment, containing area of Ав.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Olga Berchenko and Dr. Victor Barstein for their helpful discussions and comments on the manuscript.

References

[1] Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. Med Princ Pract. 2015; 42: 1-10.

[2] Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. Ann Neurol. 2013; 73: 104-119.

[3] Palop JJ, Mucke L Amyloid-β-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. Nat Neurosci. 2010; 13: 812-818.

[4] Hardy J, Selkoe DJ The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002; 297: 353-356.

[5] Grienberger C, Rochefort NL, Adelsberger H, Henning HA, Hill DN, Reichwald J, Staufenbiel M, Konnerth A Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. Nat Commun. 2012; 774: 1-10.

[6] Nakajima C, Kulik A, Frotscher M, Herz J, Schäfer M, Bock HH, May P LDL receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes. J Biol Chem. 2013; 30: 21909-21923.

[7] Selkoe DJ Soluble oligomers of the amyloid β-protein impair synaptic plasticity and behavior. Behav Brain Res. 2008; 192: 106-113.

[8] O'Brien RJ, Wong PC Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci. 2011; 34: 185-204.

[9] Maltsev AV, Dovidchenko NV, Uteshev VK, Sokolik VV, Shtang OM, Yakushin MA, Sokolova NM, Surin AK, Galzitskaya OV Intensive pro-tein synthesis in neurons and phosphorylation of beta-amyloid precursor pro-tein and tau-protein are triggering factors of neuronal amyloidosis and Alz-heimer's disease. Biomed Chem. 2013; 7: 278-293.

[10] Kim J-H, Anwyl R, Suh Y-H, Djamgoz MBA, Rowan MJ Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of β-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. J Neurosci. 2001; 21: 1327-1333.

[11] Hartmann T, Bieger SC Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. Nat Med. 1997; 3: 1016-1020.

[12] Colombo A, Bastone A, Ploia C, Sclip A, Salmona M, Forloni G, Borsello T JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2009; 33: 518-525.

[13] Andersen OM, Reiche J, Schmidt V Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 13461-13466.

[14] Ridge PG, Ebbert MT, Kauwe JS Genetics of Alzheimer's disease. Biomed Res Int. 2013; 25: 49-54.

[15] Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science. 1996; 274: 99-102.

[16] Fantini J, Garmy N, Mahfoud R Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. Expert Rev Mol Med. 2002; 4: 1-22.

[17] Puzzo D, Privitera L, Fa' M Endogenous amyloid-β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. Ann Neurol. 2011; 69: 819-830.

[18] Kimura R, MacTavish D, Yang J, Westaway D, Jhamandas JH Beta amyloid-induced depression of hippocampal long-term potentiation is mediat-ed through the amylin receptor. J Neurosci. 2012; 32: 17401-17406.

[19] Morley JE, Farr SA A physiological role for amyloid-β protein: en-hancement of learning and memory. J Alzheimer's disease. 2010; 19: 441-449.

[20] Cárdenas-Aguayo MC, Silva-Lucero MC Physiological role of amyloid beta in neural cells: the cellular trophic activity. INTECH. 2014: 1-26.

[21] Cirrito JR, May PC, O'Dell MA In vivo assessment of brain intersti-tial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. J Neurosci. 2003; 23: 8844-8853.

[22] Puzzo D, Privitera L Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. J Neurosci. 2008; 28: 14537-14545.

[23] Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H Amyloid-beta: a chame-leon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. Brain Res Brain Res Rev. 2003; 43: 1-16.

[24] Cetin F, Yazihan N, Dincer S, Akbulut G The effect of intrahippocampal beta-amyloid1-42 peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. Ann NY Acad Sci. 2007; 1100: 510-517.

[25] Curtain CC, Ali F, Volitakis I Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. J Biol Chem. 2001; 276: 20466-20473.

[26] Chen Y, Dong C Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural pro-genitor cells. Cell Death Differ. 2009; 16: 386-394.

[27] Atwood CS, Bishop GM, Perry G, Smith MA Amyloid-beta: a vas-cular sealant that protects against hemorrhage? J Neurosci Res. 2002; 70: 356.

[28] Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hy-man B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD The Alz-heimer's disease-associated amyloid β-protein is an antimicrobial peptide. PLoS ONE. 2010; 5 (3): e9505.

[29] Gu Z, Zhong P, Yan Z Activation of muscarinic receptors inhibits be-ta-amyloid peptide-induced signaling in cortical slices. J Biol Chem. 2003; 278: 17546-17556.

[30] Jellinger KA Challenges in neuronal apoptosis. Curr Alzheimer Res. 2006; 3: 377-391.

[31] Goure WF, Krafft GA, Jerecic J, Hefti F Targeting the proper amy-loid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunother-apeutics. Alzheimers Res Ther. 2015; 6: 42.

[32] Sakono M, Zako T Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers. FEBS J. 2010; 277: 1348-1358.

[33] Moreth J, Kroker KS, Schwanzar D, Schnack C Globular and proto-fibrillar Aβ aggregate simper neurotransmission by different mechanism. Bio-chem. 2013; 52: 1466-1476.

[34] Tamburri A, Dudilot A, Licea S, Bourgeois C, Boehm J NMDA-receptor activation but not ion flux is required for amyloid-beta induced syn-aptic depression. PLoS One. 2013; 8: e65350.

[35] Takamura A, Sato Y, Watabe D, Okamoto Y Sortilin is required for toxicaction of Aβ oligomers (AβOs): extracellular AβOs trigger apoptosis, and intraneuronal AβOs impair degradation pathways. Life Sci. 2012; 91: 1177-1186.

[36] Slack BE, Wurtman RJ Regulation of synthesis and metabolism of the amyloid precursor protein by extracellular signals. In: Research progress in Alzheimer's disease and dementia. M.-K. Sun, ed. 2007; 2: 1-25, Nova Science Publishers, Inc.

[37] Mattson MP Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 2004; 430: 631-639.

[38] Inflammatory diseases - immunopathology, clinical and pharmaco-logical bases; in Khatami M (ed): Mehan S, Arora R, Sehgal V, Sharma D, Sharma G Dementia: A Complete Literature Review on Various Mechanisms Involved in Pathogenesis and an Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. Rijeka, InTech. 2012: 3-19.

[39] Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. Biol Psychiatry. 2010; 68: 930-941.

[40] Minati L, Edginton T, Bruzzone MG, Giaccone G Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. Am J Alzheim Dis & Other Dementia. 2009; 24: 95-121.

[41] Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. Brain. 2006; 129: 2840-2855.

[42] Necula M, Kayed R, Milton S, Glabe CG Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. J Biol Chem. 2007; 282: 10311-10324.

[43] Birks J Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2006: CD005593.

[44] Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. Curr Pharm Des. 2006; 12: 407-428.

[45] Palmer GC Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. Curr Drug Targets. 2001; 2: 241-271.

[46] Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, Landreth G. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. J Biol Chem. 2007; 282: 26832-26844.

[47] Gray SL, Anderson ML, Crane PK, Breitner JC Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. J Am Geriatr Soc. 2008; 56: 291-295.

[48] Dinarello CA Proinflammatory cytokines. Chest. 2000; 118: 503-508.

[49] Hunter CA, Timans J, Pisacane P Comparison of the effects of inter-leukin-1, interleukin-1 and interferon- inducing factor on the production of interferon- by natural killer. Eur J Immunol. 1997; 27: 2787-2792.

[50] Engelmann H, Novick D Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. J Biol Chem. 1990; 265: 1531-1536.

[51] Dinarello CA Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. J Investigative Dermatology Symposium Proceedings. 2001; 6: 244-250.

[52] Huber TS, Gaines GS, Welborn MB Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. Shock. 2000; 13: 425-434.

[53] Lee WH, Loo CY, Bedawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neu-roscience in the 21st century. Curr Neuropharmacol. 2013; 11: 338-378.

[54] Shezad A, Lee YS (2013) Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. Biofactors. 2013; 39: 27-36.

[55] Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC Anticancer potential of curcu-min: preclinical and clinical studies. Anticancer Res. 2003; 23: 363-398.

[56] Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-κB ligand-induced NF-κB activation in osteo-clast precursors and suppresses osteoclastogenesis. J Immunol. 2004; 172: 5940-5947.

[57] Teiten MN, Dicato M, Diederich V Curcumin as a regulator of epige-netic events. Mol Nutr Food Res. 2013; 57: 1619-1629.

[58] Mithu VS, Sarkar B, Bhowmik D, Das AK, Chandrakesan M, Maity S, Madhu PK Curcumin alters the salt bridge-containing turn region in amyloid (1-42) aggregates. The Journal of Biological Chemistry. 2014; 289: 11122-11131.

[59] Ishimura H, Kadoya R, Suzuki T, Murakawa T, Shulga S, Kurita N Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: Ab initio molecular simulations. Chemical Physics Letters. 2015; 633: 139-145.

[60] US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870. 100. Washington: US EPA; 2012.

[61] Vorobjova TM Role of limbic and reticular systems in self stimulation. Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatel'nosti imeni I. P. Pavlova. 1969; 19: 680-686.

[62] Bureš J, Petráň M, Zachar J Electrophysiological methods in biological research. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. 1960: 528.

[63] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J Pharm Biomed Anal. 1997; 15: 1867-1876.

[64] Bakker JM, Kavelaars A, Kamphuis PJ, Cobelens PM, van Vugt HH, van Bel F, Heijnen CJ Neonatal dexamethasone treatment increases suscepti-bility to experimental autoimmune disease in adult rats. J Immunol. 2000; 165: 5932-5937.

[65] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ Protein measure-ment with Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.

[66] 66. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A Duvaud S., Wilkins M. R., Ap-pel R. D., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Hu-mana Press. 2005: 571-607.

[67] Ashokan KV, Mundaganur DS, Mundaganur YD. Catalase: phylo-genetic characterization to explore protein cluster. J. Res. Bioinformatics. 2010; 1: 1-8.

[68] Sokolik VV Protein is coded in genome and synthesized in ribosomes as a structural template of a rotameric version sequence of peptide bound con-figuration. The International Moscow Conference on Computational Molecular Biology.

[69] Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L CHARMM: the biomolecular simulation program. J Comput Chem. 2009; 30: 1545-1614.

[70] Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinformatics. 2013; 29: 845-854.

[71] Molecular modeling, 3rd Ed. Höltje H-D, Sippl W, Rognan D, Folkers G John Wiley & Sons, Hoboken NJ 2008: 320.

[72] Protein ligand docking and virtual screening with GOLD. Cole J, Niessink J, Taylor R. In Virtual Screening in Drug Discovery (Eds. J. Alvarez, B. Shoichet), Taylor & Francis CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 2005.

[73] DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scien-tific, San Carlos, CA, USA 2002.

[74] Sokolik VV, Maltsev AV Cytokines neuroinflammatory reaction to β-amyloid 1-40 action in homoaggregatic and liposomal forms in rats. Biomed Chem. 2015; 9: 220-225.

[75] Stacklies W, Seifert C, Graeter F Implementation of force distribu-tion analysis for molecular dynamics simulations. BMC Bioinformatics. 2011; 101: 1-5.

[76] Venselaar H, Krieger E, Vriend G Homology modeling. Structural Bioinformatics. 2nd Edition. Wiley-Blackwell, Hoboken. 2009: 715-736.

[77] Samofalova DA, Karpov PA, Blume YB Bioinformatic comparison of human and higher plant phosphatomes. Citol Genet. 2015; 49: 207-219.

[78] Fändrich M, Schmidt M, Grigorieff N Recent progress in understand-ing Alzheimer's β-amyloid structures. Trends Biochem Sci. 2011; 36: 338-345.

[79] Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A J Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. Med Princ Pract. 2015; 24: 1-10.

[80] Ridolfi E, Barone C, Scarpini E, Galimberti D The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an eye on microglia. Clin Dev Immunol. 2013: 939786.

[81] Boutajangout A, Wisniewski T The innate immune system in Alzheimer's disease. Int J Cell Biol. 2013: 576383.

[82] Combs CK, Karlo JC, Kao S-C β-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFα-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. Journal of Neuroscience. 2001; 21: 1179-1188.

[83] Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Research Bulletin. 2012; 87: 10-20.

[84] Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. Progress in Neurobiology. 2009; 87: 181-194.

[85] Hasima N, Aggarwal BB Targeting proteasomal pathways by dietary curcumin for cancer prevention and treatment. Curr Med Chem. 2014; 21: 1583-1594.

[86] Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. Br J Pharmacol. 2013; 169: 1672-1692.

[87] Plummer SM, Holloway KA, Manson MM Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-κB activation via the NIK/IKK signalling complex. Oncogene. 1999; 18: 6013-6020.

[88] Jobin CC, Bradham A, Russo MP, Juma B Curcumin blocks cyto-kine-mediated NF-κB activation and proinflammatory gene expression by in-hibiting inhibitory factor IB kinase activity. J Immunol. 1999; 163: 3474-3483.

[89] Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK Comparative studies on the suppres-sion of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IB kinase and NF-κB activation in macrophages. Biochem Pharmacol. 2000; 60: 1665-1676.

[90] Banerjee R. Effect of curcumin on the metal ion induced fibrillization of Amyloid-β peptide. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014; 117: 798-800.

[91] Liu KN, Lai CM, Lee YT, Wang SN, Chen RP, Jan JS, Liu HS, Wang SS Curcumin's pre-incubation temperature affects its inhibitory potency toward amyloid fibrillation and fibrilinduced cytotoxicity of lysozyme. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1820: 1774-1786.

[92] Reinke AA, Gestwicki JE Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: Influence of linker length and flexibility. Chemical Biology & Drug Design. 2007; 70: 206-215.

[93] Yang FS, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. Journal of Biological Chemistry. 2005; 280: 5892-5901.

[94] Airoldi C, Zona C, Sironi E, Colombo L Curcumin derivatives as new ligands of A beta peptides. Journal of Biotechnology. 2011; 156: 317-324.

[95] Mourtas S, Canovi M, Zona C Curcumin-decorated nanoliposomes with very high affinity for amyloid-β 1-42 peptide. Biomaterials. 2011; 32: 1635-1645.

[96] Taylor M, Moore S, Mourtas S, Niarakis A Effect of curcumin associated and lipid ligand-functionalized nanoliposomes on aggregation of the Alzheimer's Aβ peptide. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medi-cine. 2011; 7: 541-550.

[97] Kozmon S, Tvaroska I Molecular dynamic studies of amyloid-beta interactions with curcumin and Cu2+ ions. Chemical Papers. 2015; 69: 1262-1276.

[98] Zhao LN, Chiu S-W, Benoit J, Chew LY, Mu YG The effect of cur-cumin on the stability of Aβ dimers. The Journal of Physical Chemistry B. 2012; 116: 7428-7435.

5.4 Взаємодія похідних куркуміну з Tau протеїном: молекулярний докінг та молекулярне моделювання методом *ab initio*.

Journal of Molecular Graphics and Modelling 98 (2020) 107611

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/JMGM

Specific interactions between tau protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular orbital simulations

Riku Sato [a], Shivani Vohra [b], Shohei Yamamoto [a], Katsumi Suzuki [a], Karpov Pavel [c], Sergiy Shulga [c], Yaroslav Blume [c], Noriyuki Kurita [a, *]

[a] Department of Computer Science and Engineering, Toyohashi University of Technology, Toyohashi, 441-8580, Japan
[b] Chemical Engineering, Grove School of Engineering, The City College of New York, 160 Convent Avenue New York, NY, 10031, USA
[c] Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, 2a. Osypovskogo Str., Kyiv-123, 04123, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 December 2019
Received in revised form
27 March 2020
Accepted 27 March 2020
Available online 31 March 2020

Keywords:
Alzheimer's disease
Tau protein
Curcumin
Molecular simulation
Fragment molecular orbital

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder in the world, and there is currently no potent medicine for the treatment of ADs. Curcumin, a primary chemical contained in the ancient Indian herb known as turmeric, has been extensively studied and shown to be effective in inhibiting the aggregations of amyloid-β and tau proteins, both of which are observed in the brains of AD patients. In the present study, we focused on the tau protein and investigated its specific interactions with curcumin derivatives, using molecular simulations based on molecular docking, molecular mechanics and *ab initio* fragment molecular orbital calculations. Based on the results, we attempted to propose novel potent inhibitors against the tau protein aggregation. Our molecular simulations provide useful information for developing novel medicines for the treatment of ADs.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurogenerative disease and currently a leading cause of dementia worldwide. New therapeutic approaches to ADs are essential, because currently available drugs are useful only in the treatment of symptoms. The two quite characteristics of ADs are senile plaques and neurofibrillary tangles in the brains of AD patients. Senile plaques are caused by the aggregations of amyloid beta (Aβ) peptide, which is generated from amyloid precursor protein (APP). Neurofibrillary tangles are primarily comprised of tau proteins, which play important roles in the stabilization of microtubules in the brain [1]. Since the mechanisms of tau-associated neurodegeneration are still unclear, many studies have focused on inhibiting the aggregation of tau proteins as a strategy to prevent its toxicity to the neurons. In the progression of ADs, these tau proteins begin to detach from the microtubule and aggregate into neurofibrillary tangles, which are recognized to be related with the onset of neuronal dysfunction.

In the brains of AD patients, six isoforms of tau proteins are expressed. The sizes of these tau proteins are in the range from 352 to 441 amino acid residues. These proteins aggregate into neurofibrillary tangles, in which paired helical filaments (PHFs) are formed by the double helical stacking of C-shaped tau-protein subunits [2]. It is hypothesized that the formation of these PHFs is closely linked to the hyper-phosphorylation of tau protein, which is caused by the addition of phosphate groups to the amino acids such as serine, threonine, and tyrosine. This hyper-phosphorylation disrupts the ability of tau protein to bind to the microtubule, resulting in its separation from the microtubule and aggregation into neurofibrillary tangles [3].

Polyphenol compound curcumin is extracted from *Curcuma longa* and has several anti-inflammatory and antioxidant properties. In the previous inverse molecular docking study [4], the potential targets of curcumin were predicted among all human proteins from the Protein Data Bank. The results prioritized several target proteins, and some of them are related with cancer and Alzheimer's disease. Although curcumin has several therapeutic properties, it is not suitable for clinical use due to its low solubility and bioavailability.

To overcome the weakness of curcumin, several curcumin derivatives were synthesized [1], and their effect on the inhibition of the aggregations of both Aβ and tau proteins were investigated. In

* Corresponding author. Toyohashi University of Technology, Department of Computer Science and Engineering, Tempaku-cho, Toyohashi, 441-8580, Japan.
E-mail address: kurita@cs.tut.ac.jp (N. Kurita).

https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107611
1093-3263/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

fact, the aggregation inhibitions of both Aβ and tau proteins were measured in terms of the IC_{50} value of each ligand, which essentially means the amount of the compound required to inhibit the Aβ or tau protein function to 50%. We here used the IC_{50} values to select five curcumin derivatives with the best inhibitory ability on tau protein. Their chemical structures and IC_{50} values are shown in Fig. 1.

The previous experiment [5] indicates that the diketone (two central oxygen atoms) at the center of curcumin is unstable in aqueous solution. Therefore, a modification at the diketone site was made to produce PE859 (Fig. 1f) from 3E (Fig. 1e), which has already proven to be fairly effective. Indeed, the central diketone of 3E was replaced by a pyrazole group to produce PE859. When the same amount of 3E or PE859 derivative was administered to mice, the concentration measured for up to 3 h of PE859 was approximately 300 times larger than that of 3E, suggesting that the modification at the diketone site can improve the pharmacokinetic ability of PE859. Therefore, PE859 is expected to be more effective than 3E and curcumin for inhibiting both tau and Aβ aggregations.

In the present study, we have used *ab initio* molecular simulations to investigate the specific interactions between the tau protein and the six curcumin derivatives shown in Fig. 1. Additionally, we have clarified which of these derivatives bind more strongly to the tau protein and can inhibit the aggregation of tau proteins. The molecular simulations are based on molecular docking (protein-ligand docking) simulations, molecular mechanics (MM) optimizations, and *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. Our results on the specific interactions between tau protein and the curcumin derivatives provide useful information for proposing novel potent inhibitors against the aggregation of tau proteins.

2. Details of molecular simulations

2.1. Construction of structures for tau protein + derivative complexes

As an initial structure of tau protein, we here employed a chain A monomer in the tau decamer registered in the PDB (PDB ID: 5O3L [2]). The protonation states of His residues in the tau monomer were assigned based on the pKa value predicted by the PROPKA3.0 program [6,7]. His residues, which have a pKa value larger than 6 and are located on the surface of tau protein, were assigned as Hip^+ protonation, while His residues with a smaller pKa value and located inside the tau protein were assigned as Hie or Hid protonation. The assignment of Hie or Hid was done by considering the steric hindrance around each of the His residues.

To properly consider the solvation effect on the tau protein, we added water molecules with a layer of 8 Å around it. The solvated structure was optimized by using the molecular mechanics (MM) method of the MM and molecular dynamics simulation program AMBER2018 [8]. In the MM optimizations, AMBER14SB force field [9] and TIP3P model [10] were assigned for the tau protein and the water molecules, respectively. The threshold value of energy gradient for convergence in the MM optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å.

We here employed curcumin and its derivatives, compounds 2B, 2C, 3A, 3E and PE859 as candidate inhibitors against the aggregation of tau proteins. Their chemical structures and IC_{50} values are shown in Fig. 1. Their structures were fully optimized by using the B3LYP/6-31G (d,p) method of the *ab initio* molecular orbital (MO) calculation program Gaussian16 (G16) [11]. The charge distribution of the optimized structure was evaluated by the restrained electrostatic potential (RESP) analysis [12], using the HF/6-31G(d) method of G16. Based on this charge distribution, atomic charge parameters of the force fields employed in the MM optimizations were constructed. The partial atomic charges of atoms composing curcumin and its derivatives are listed in Table S1 of the supplementary information.

The initial conformation of the curcumin derivative bound to the tau protein was predicted from the molecular docking simulations using the protein-ligand docking program AutoDock4.2 [13]. We set the large grid box of docking covering the whole structure of the tau protein and searched the docking sites of the curcumin derivative on the tau protein widely. The size of the grid box was $44.25 \times 42.75 \times 15$ $Å^3$, and the center of the grid box was set as the center of the tau protein. In the docking simulations, the tau structure was fixed, while the structure of the derivative was freely relaxed, in order to obtain various types of structures for the docked derivative. 256 candidate structures of the derivative were created

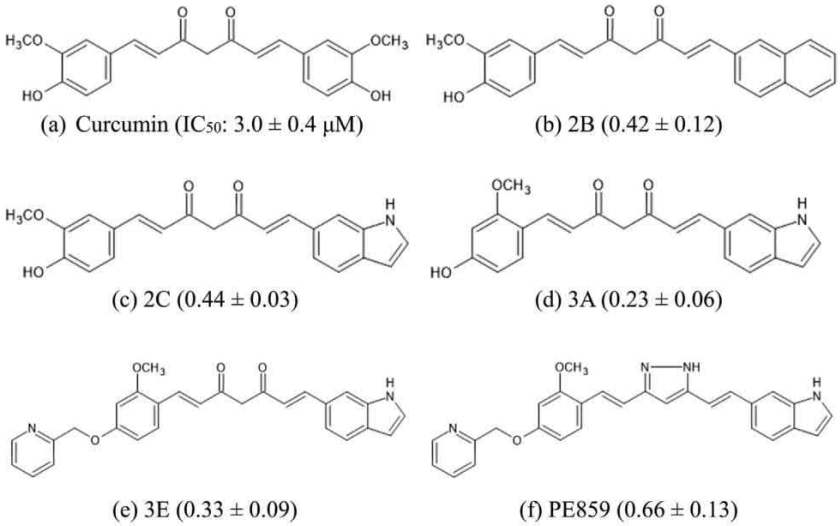


Fig. 1. Chemical structures and IC_{50} values [1] (μM) of curcumin and its derivatives employed in the present study; (a) curcumin, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E and (f) PE859.

Table 1
Lowest binding energy (BE: kcal/mol) and number of poses for each cluster obtained by AutoDock 4.2. The created 256 poses were clustered based on their structural similarity, and each cluster was ranked in the order of BE between tau protein and curcumin derivatives; (a) curcumin, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E and (f) PE859.

(a) Curcumin		
Rank	BE	Poses
1	−4.49	14
2	−3.95	11
3	−4.25	7
4	−3.67	6
5	−3.83	5
6	−3.51	5
7	−3.71	4
(b) 2B		
Rank	BE	Poses
1	−5.53	25
2	−5.12	21
3	−5.36	11
4	−4.91	10
5	−5.07	9
6	−3.96	9
7	−5.32	6
8	−4.68	6
9	−4.56	6
(c) 2C		
Rank	BE	Poses
1	−5.08	17
2	−4.81	14
3	−5.29	11
4	−4.65	11
5	−4.84	9
6	−4.54	7
7	−4.23	7
8	−4.21	6
d) 3A		
Rank	BE	Poses
1	−5.14	15
2	−4.71	13
3	−4.51	11
4	−4.72	10
5	−4.71	9
6	−4.70	8
7	−4.27	8
8	−4.26	7
(e) 3E		
Rank	BE	Poses
1	−4.03	9
2	−4.81	7
3	−4.79	7
4	−4.34	7
5	−3.97	6
6	−4.94	5
7	−4.27	5
8	−4.09	5
(f) PE859		
Rank	BE	Poses
1	−5.93	23
2	−5.75	14
3	−5.75	12
4	−5.68	7
5	−5.58	7
6	−5.79	6
7	−5.69	6
8	−5.69	6
9	−5.54	6
10	−5.35	6

by AutoDock4.2 and they were grouped into several clusters based on their structural similarity. The threshold distance (RMS tolerance) for clustering these structures was set as listed in Table S2 of the supplementary information, to create reasonable number of clusters for each derivative. It is noted that the RESP charges listed in Table S1 were assigned for the curcumin derivatives in the docking simulations, to describe properly the electrostatic interactions between the derivative and the amino acid residues of tau protein.

2.2. MM optimizations and FMO calculations for tau protein + derivative complexes

We first ranked the clusters of candidate poses created by AutoDock based on the number of the poses included in each cluster, because the larger number of poses indicates the higher possibility that the derivative has one of the structures included in the cluster. In fact, we selected the top ten ranked clusters for each complex, and the representative structures included in each of the clusters were employed as initial structures of the complexes in the following molecular simulations.

To consider the effects of water molecules around the complex, we added water molecules with a layer of 8 Å around the complexes and optimized the structures in explicit water molecules. In the MM optimizations, AMBER14SB force field [9], TIP3P model [10] and general AMBER force field (GAFF) [14] were assigned for the tau protein, the water molecules and the curcumin derivatives, respectively. The threshold value of energy gradient for convergence in the MM optimization was set as 0.0001 kcal/mol/Å.

Finally, we conducted the *ab initio* FMO calculations for the optimized structures of the complexes and investigated precisely the specific interactions between the tau protein and the derivative. In the FMO calculations [15], a target molecule is divided into fragments, and electronic states of the target molecule are evaluated from the electronic states of monomers and dimers of the fragments.

It is noted that the water molecules existing within 5 Å from the derivative were considered explicitly, to describe accurately the effect of these water molecules on the specific interactions between tau protein and the derivative. For all complexes, the number of water molecules is uniformed to the minimum number among all the clusters, in order to compare the total energies of the candidate structures included in all clusters. The termini of the tau protein were treated with hydrogen capping to offset the charges of the termini.

In addition, to predict the binding affinity between tau protein and the derivative, the binding energy (BE) between tau protein and the derivative was estimated from the total energies (TEs) of the component structures using the following equation. The lower BE indicates the stronger binding between tau protein and the derivative.

$$\mathrm{BE} = \mathrm{TE}\,(\mathrm{complex} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}\,(\mathrm{Tau} + \mathrm{water}) - \mathrm{TE}\,(\mathrm{derivative} + \mathrm{water}) + \mathrm{TE}\,(\mathrm{water})$$

In the FMO calculations, the MP2 [16,17]/6-31G(d) method of the FMO calculation program ABINIT-MP Ver.6.0 [18] was used to accurately investigate the π−π stacking, NH−π and CH−π interactions as well as the hydrogen-bonding and electrostatic ones between the tau protein and the derivatives. Each amino acid residue of tau, the derivative and each water molecule were assigned to a fragment in the FMO calculations, because this fragmentation enables to analyze the interactions between the derivative and each residue of tau protein affected by the solvating water molecules. In addition, to highlight the important tau residues for the binding of

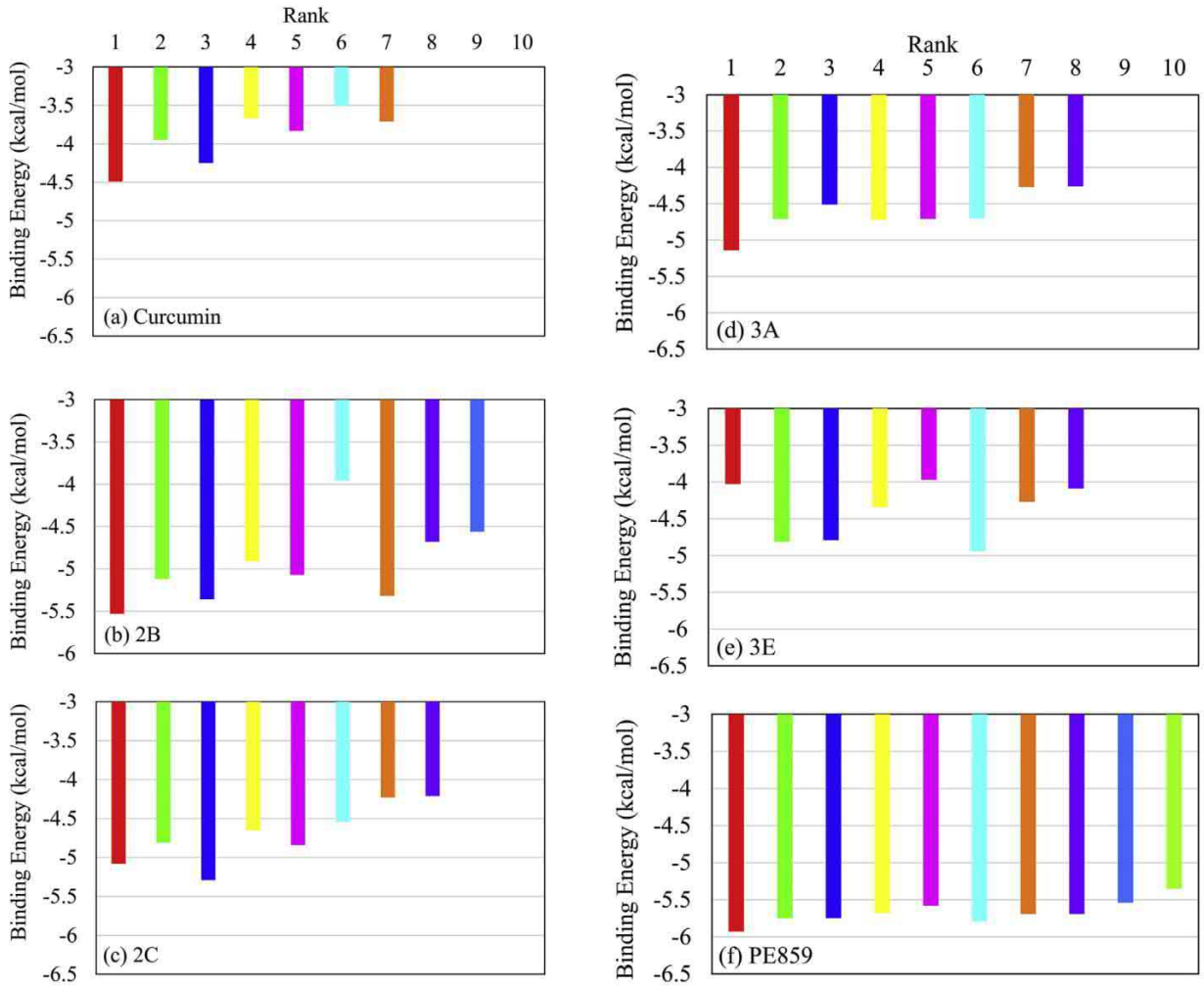


Fig. 2. Binding energies (BEs) between tau protein and curcumin derivatives obtained by AutoDock 4.2; (a)curcumin, (b)2B, (c)2C, (d)3A, (e)3E and (f)PE859. The BEs for Rank 1 to Rank 10 clusters are indicated by bars in red, green, blue, yellow, magenta, cyan, orange, purple, deep sky-blue and lime, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

the derivative, we analyzed the inter fragment interaction energies (IFIEs) [19] obtained by the FMO calculations. In the previous free energy perturbation calculations [20,21], the solvation free energies of deoxyribonucleoside triphosphates were evaluated in a similar way as the present FMO calculations.

3. Results and discussion

3.1. Stable structures of tau protein + derivative complexes

The results of molecular docking simulations are listed in Table 1, where the lowest BEs and the number of poses for each cluster obtained by AutoDock4.2 are compared for the six complexes with different derivatives. The created poses were classified into several clusters. Among them, we selected the clusters, which include the larger number of poses than six or five, and these clusters were ranked based on the number of poses included in each cluster. For the tau + curcumin complex, we additionally selected the cluster having only four poses, because the number of clusters selected for the curcumin complex are smaller compared with those of the other complexes. The BEs for each complex obtained by AutoDock 4.2 are graphically illustrated in Fig. 2. The BEs for Rank 1 to Rank 10 clusters are indicated by bars in red, green, blue, yellow, magenta, cyan, orange, purple, deep sky-blue and lime, respectively. These BEs indicate that PE859 and 2B bind more strongly to the tau protein in the AutoDock simulations.

To elucidate the binding sites of each derivative to the tau protein, the structures of all clusters listed in Table 1 were superimposed. As shown in Fig. 3, AutoDock was found to create different binding conformations of the derivatives, which are distributed over the whole structure of tau protein. In addition, some preferable binding-sites on the tau protein for each derivative were found to be dependent on the derivatives. In Fig. 3, the conformation for the top-ranked cluster is shown by red color, indicating that each derivative can bind to the different binding sites of the tau protein. Therefore, it can be confirmed that AutoDock creates a variety of candidate conformations of the derivatives bound to the tau protein.

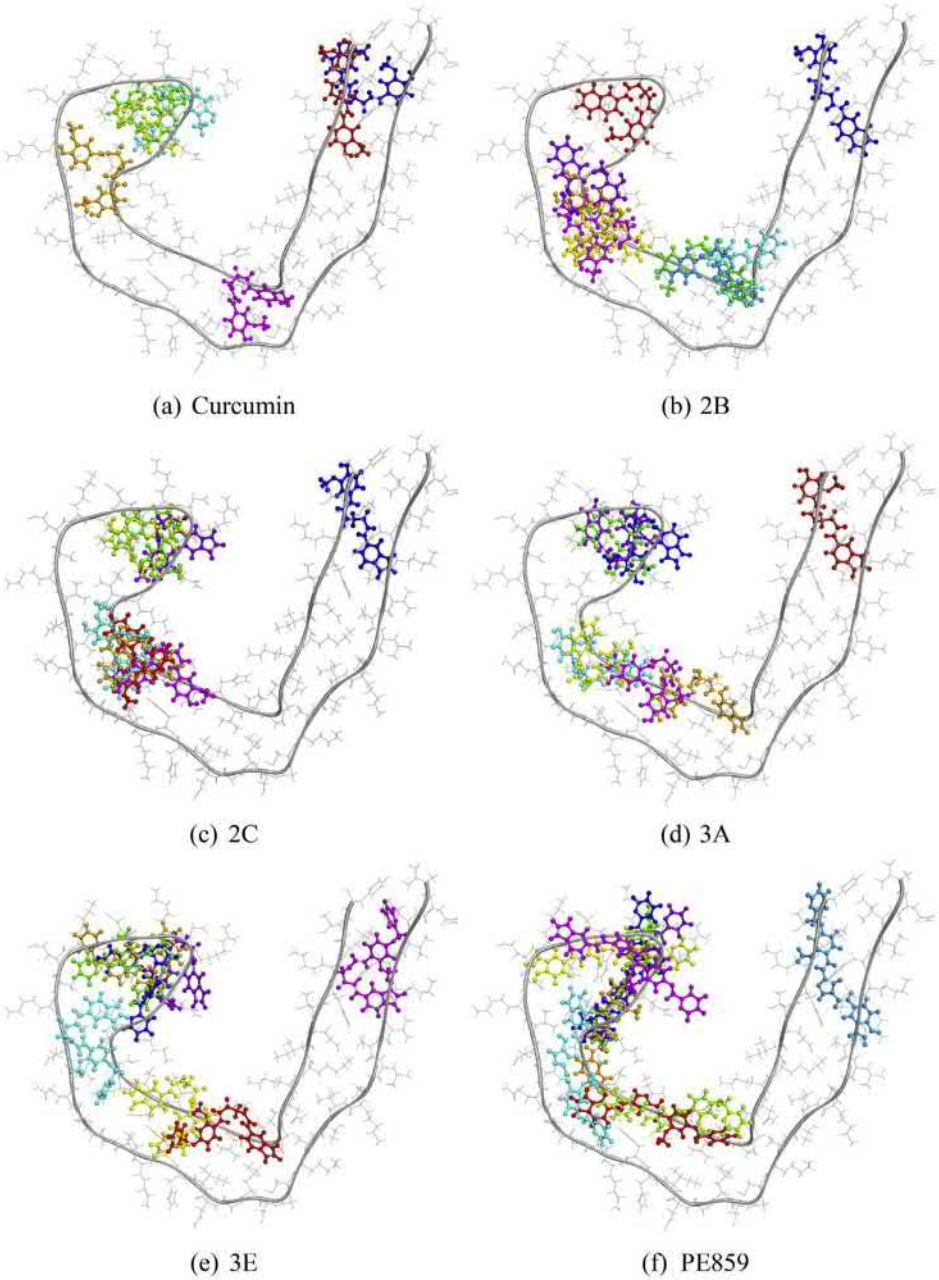


Fig. 3. Conformations of derivatives docked to tau protein (gray) obtained by AutoDock 4.2; (a)curcumin, (b)2B, (c)2C, (d)3A, (e)3E and (f)PE859. Representative conformations for Rank 1 to Rank 10 clusters are indicated in red, green, blue, yellow, magenta, cyan, orange, purple, deep sky-blue and lime, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

The representative structures for all the clusters listed in Table 1 were fully optimized by the MM method in water, considering the water molecules around the complex explicitly. All derivatives were found to keep on binding to the tau protein even after the MM optimizations.

3.2. Electronic states of tau protein + derivative complexes

To clarify which structure is the most stable, we investigated the total energies (TE) of the complexes and the total IFIEs between each derivative and all tau protein residues, using *ab initio* FMO calculations. As listed in Table 2a, for the tau + curcumin complex,

Table 2
Total energies (TEs) of the complexes, and total inter fragment interaction energies (IFIEs) between tau residues and curcumin derivatives; (a) curcumin, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E and (f) PE859. Unit of energy is kcal/mol.

(a) Curcumin			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−20610147.2	199.4	−78.3
2	−20610267.1	79.5	−71.6
3	−20610194.8	151.8	−72.8
4	−20610259.2	87.4	−76.9
5	−20610341.1	5.5	−87.6
6	−20610178.4	168.2	−63.9
7	−20610346.6	0.0	−99.1
(b) 2B			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−20061409.5	272.5	−76.6
2	−20061519.3	162.6	−125.6
3	−20061323.5	358.4	−62.1
4	−20061613.2	68.8	−52.3
5	−20061681.9	0.0	−88.1
6	−20061620.4	61.5	−102.6
7	−20061565.4	116.5	−95.8
8	−20061556.1	125.8	−67.8
9	−20061511.0	170.9	−82.1
(c) 2C			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−20334770.6	64.9	−111.4
2	−20334701.6	133.9	−78.5
3	−20334527.6	307.9	−53.6
4	−20334697.6	137.8	−53.7
5	−20334776.8	58.6	−107.2
6	−20334835.4	0.0	−104.0
7	−20334757.1	78.3	−49.0
8	−20334704.6	130.8	−63.6
(d) 3A			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−20143220.6	264.2	−48.7
2	−20143420.8	64.1	−70.3
3	−20143303.7	181.1	−65.2
4	−20143441.2	43.6	−80.7
5	−20143461.6	23.3	−87.7
6	−20143484.9	0.0	−101.6
7	−20143447.2	37.7	−117.2
8	−20143392.4	92.5	−65.6
(e) 3E			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−21183412.9	181.5	−108.5
2	−21183488.3	106.1	−86.1
3	−21183422.1	172.3	−83.6
4	−21183464.8	129.6	−113.0
5	−21183399.2	195.2	−68.6
6	−21183594.4	0.0	−67.7
7	−21183395.1	199.3	−83.5
8	−21183423.0	171.4	−86.3
(f) PE859			
Rank	TE	ΔTE	IFIE
1	−21397119.8	32.4	−138.7
2	−21396841.0	302.2	−75.5
3	−21396901.3	250.9	−82.5
4	−21396751.8	400.4	−80.7
5	−21396921.6	230.6	−83.9
6	−21397029.7	122.5	−70.7
7	−21396908.7	243.5	−78.1
8	−21396902.8	249.4	−74.9
9	−21396900.3	251.9	−68.3
10	−21397152.2	0.0	−131.5

Table 3
Total IFIEs between tau protein and derivative (T-D), between tau protein and waters (T-W), between derivative and waters (D-W), between waters (W-W), and between tau protein amino acids (T-T) for the complexes of tau proteins with derivatives; curcumin, 2B, 2C, 3A, 3E and PE859. BEs between tau protein and the derivatives are listed for comparison. Unit of energy is kcal/mol.

Derivative	Cluster	T-D	T-W	D-W	W-W	T-T	BE
Curcumin	5	−87.6	−207.5	−91.7	−646.0	−920.1	−69.5
	7	−99.1	−212.8	−87.1	−613.0	−995.7	−76.9
2B	2	−125.6	−216.6	−49.7	−330.0	−969.4	−86.7
	5	−88.1	−277.8	−60.0	−503.0	−1001.5	−57.9
2C	1	−111.4	−262.1	−49.2	−496.2	−900.4	−83.1
	6	−104.0	−347.3	−54.9	−534.0	−913.6	−74.1
3A	7	−117.2	−210.1	−47.4	−396.0	−1029.7	−86.6
	6	−101.6	−299.8	−50.2	−460.5	−929.2	−74.5
3E	4	−113.0	−188.3	−67.2	−729.2	−953.9	−86.5
	6	−67.7	−320.0	−106.7	−762.5	−941.8	−51.0
PE859	1	−138.7	−387.6	−87.5	−822.1	−864.1	−97.7
	10	−131.5	−345.9	−63.6	−808.9	−984.6	−91.1

Table 4
BE (kcal/mol) between each derivative and tau protein, and tau residues with attractive interaction lower than −10 kcal/mol with each derivative. Charges of charged amino acid residues are indicated by + or - sign.

Derivative	BE	Tau residues
Curcumin	−76.9	Val337, Val339, Ser341, Ile354
2B	−86.7	Thr361, Hip362 (+), Lys369 (+)
2C	−83.1	Gly334, Lys353 (+), Ile354, Asp358(−), Asn359
3A	−86.6	Thr361, Hip362 (+), Lys369 (+)
3E	−86.5	Hip 330 (+), Asp358(−), Thr361, Hip362 (+)
PE859	−97.7	Leu357, Asp358(−), Hip362 (+)

the structure of the cluster 7 is the most stable and its total IFIE is the lowest among the seven clusters. Therefore, it was confirmed that the trends of the sizes for the TEs and the total IFIEs are comparable to each other for the tau + curcumin complex.

In contrast, for the tau+2B complex, the cluster 5 is the most stable, whereas the cluster 2 has the lowest total IFIE, as listed in Table 2b. To elucidate the reason for this discrepancy, we investigated the total IFIEs between tau and derivative (T-D), between tau and waters (T-W), between derivative and waters (D-W), between waters (W-W) and between tau amino acids (T-T). These values for the both structures with the lowest TE and the lowest total IFIE among the clusters are compared in Table 3, in which the BEs between tau protein and derivative are also listed for comparison. The cluster 5 of the tau+2B complex has lower IFIEs between tau-water and between waters compared with the cluster 2. In particular, the W-W IFIE for the cluster 5 is significantly lower than that for the cluster 2, indicating that water molecules have more preferable configurations in the cluster 5. On the other hand, the BE of the cluster 2 is significantly lower than that of the cluster 5. Therefore, the 2B derivative is expected to bind more strongly to the tau protein in the conformation of the cluster 2. Similar results were obtained for the complexes with 2C, 3A and 3E derivatives, as indicated in Table 3, whereas the tau + PE859 complex has a different trend.

To clarify the reason for these results, we checked the distributions of water molecules around the complexes. We here employed the water molecules existing within 5 Å from the derivative, to consider their effect of bridging between the tau protein and the derivative. As a result, water molecules do not cover the whole structure of the tau protein, as shown in Fig. S1 of the supplementary information for the tau+2B complex. Because of such a localized distribution of water molecules, the total energy of the solvated complex fluctuates so significantly depending on the distribution of the water molecules for each cluster, as indicated in Table 2. Accordingly, we considered that it

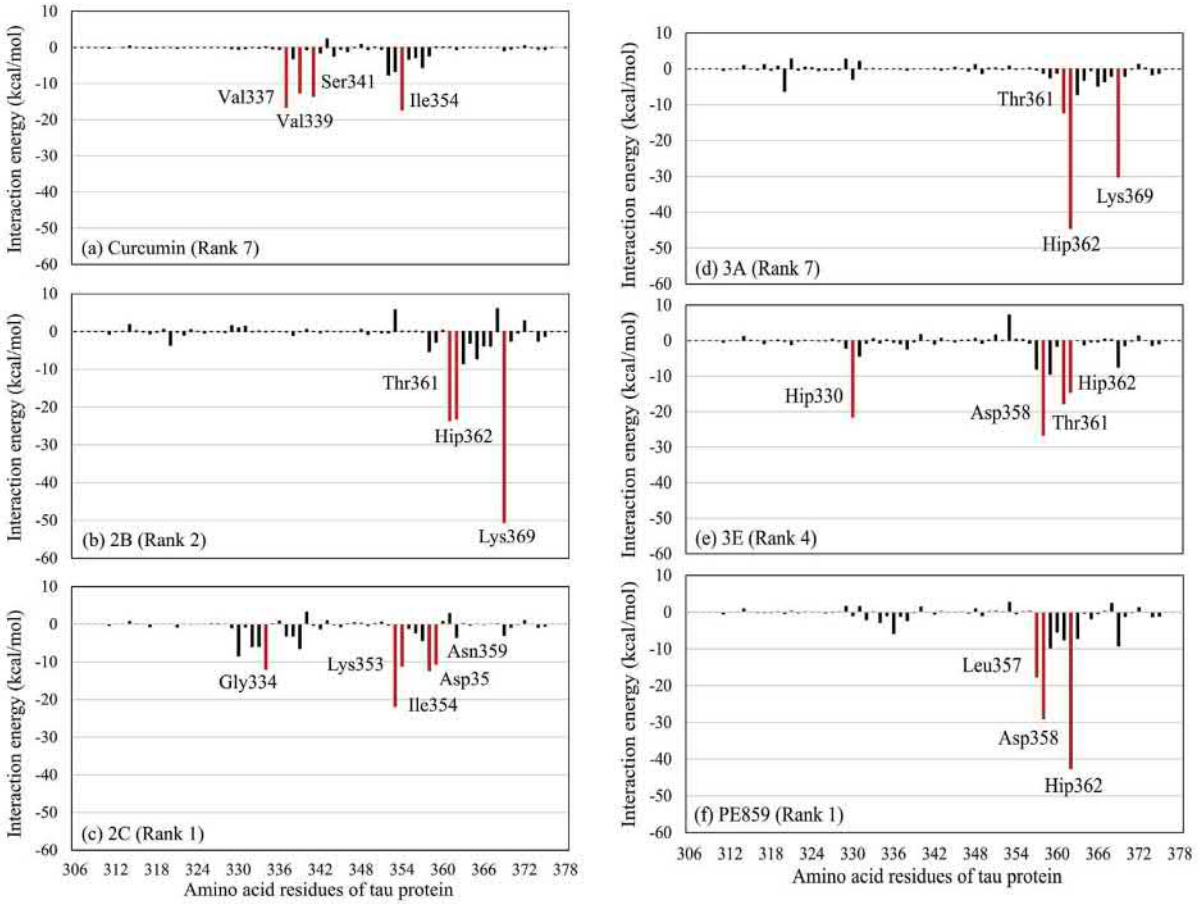


Fig. 4. Interaction energies between each amino acid residue of tau protein and curcumin derivative for the structure having the lowest BE; (a) curcumin, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E and (f) PE859. Red lines indicate the residues with attractive interaction lower than −10 kcal/mol with derivative. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

is not proper to select the candidate structure based on the total energy of the solvated complex, and we here selected the cluster with the lowest total IFIE as the preferable structure of the complex with curcumin derivative.

As listed in the last column of Table 3, PE859 has the lowest BE among the five curcumin derivatives. The BE of PE859 is about 20 kcal/mol lower than that of curcumin. Therefore, it is expected that PE859 can bind more strongly to the tau protein and inhibit the aggregation of tau proteins.

To elucidate the reason for the lower BE of PE859, we analyzed the specific interaction energies between the derivative and each amino acid residue of tau protein. As shown in Table 4 and Fig. 4, all curcumin derivatives have significant attractive interactions with the charged amino acid residues such as Hip, Lys and Asp. In particular, in the tau + PE859 complex, Hip362 and Asp358 have strong attractive interactions with PE859, as shown in Fig. 4f. In addition, Fig. 4b clearly indicates that 2B interacts strongly with the positively charged Lys369 and Hip362. Therefore, it is expected that the charged amino acid residues of tau protein are important for its strong binding to the curcumin derivatives.

We moreover analyzed the interacting structures between curcumin or its derivative and some tau residues in the complex. As shown in Fig. 5a, the hydroxy groups on the both sides of curcumin form hydrogen bonds with Val337 or Ser341, while the oxygen atoms of the methoxy groups interact electrostatically with Val337 and Ser341. On the other hand, the β-diketone group at the central part has no significant contribution to the binding of curcumin to tau protein, although it interacts with Ile354.

In contrast, the β-diketone group of the derivative 2B forms a strong hydrogen bond with the terminal NH_3 group of Lys369, as shown in Fig. 5b, resulting in the strong attractive interaction between 2B and Lys369 shown in Fig. 4b. In addition, the oxygen atoms of the hydroxy and the methoxy groups form hydrogen bonds with the backbone of Thr361.2B has also electrostatic and CH-π interactions with the side chain of Hip362. Therefore, it is elucidated from the comparison between curcumin and 2B that the removal of the hydroxy and the methoxy groups on one side of curcumin causes significant change in the interactions between curcumin and tau protein, resulting in the lower BE of 2B derivative compared with curcumin. This lower BE is comparable to the smaller IC_{50} value of 2B compared with curcumin.

Figs. 4c and 5c and show the specific interactions between tau protein and 2C, in which the naphthalene of 2B is replaced by an indole ring. As indicated in Fig. 4c, the strong attractive interaction

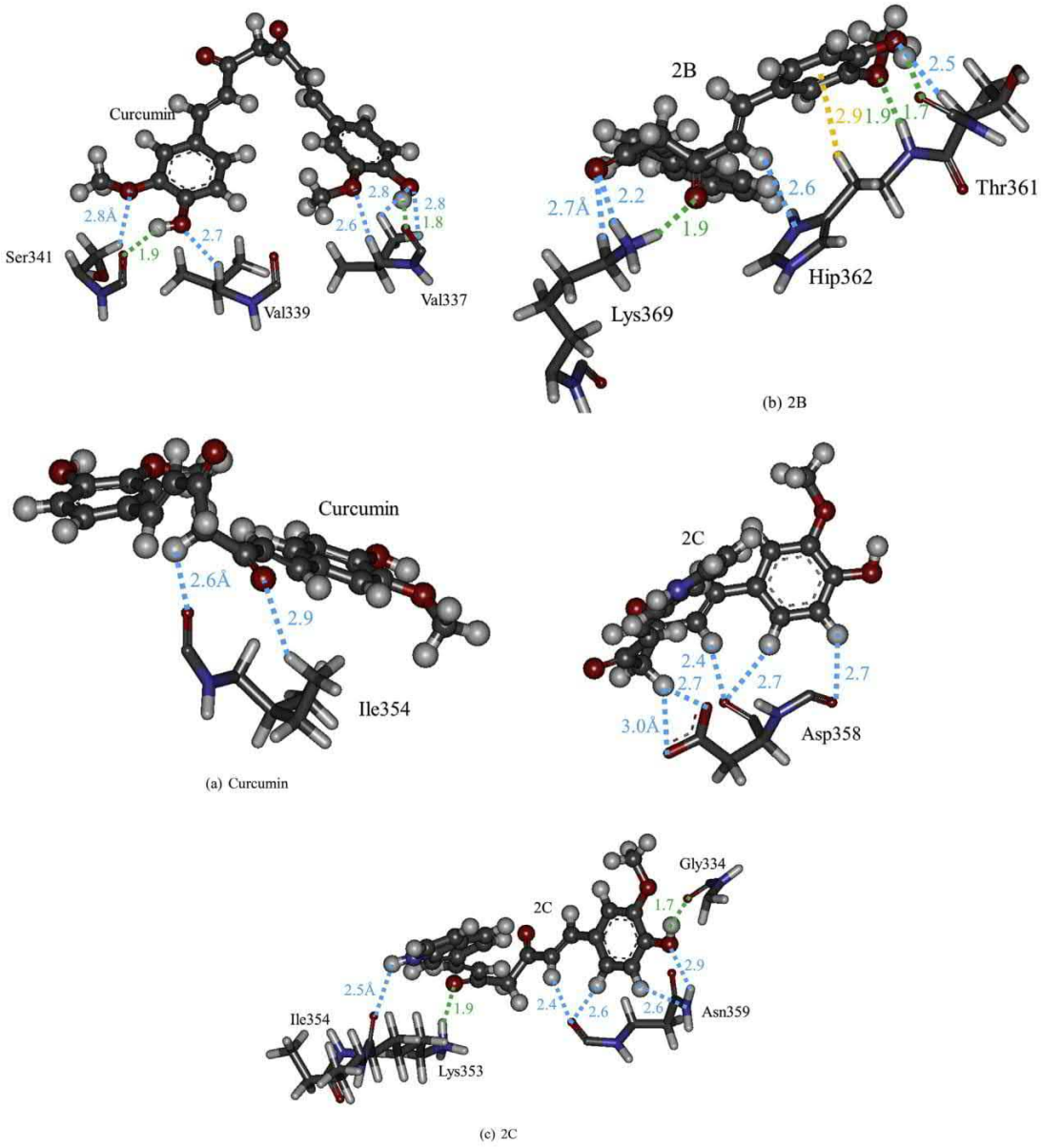


Fig. 5. Specific interactions between curcumin derivative and some important amino acid residues of tau protein for the structure having the lowest BE; (a) curcumin, (b) 2B, (c) 2C, (d) 3A, (e) 3E and (f) PE859. Green, blue, yellow, and black lines indicate hydrogen bond, electrostatic interaction, CH-π interaction, and weak attractive interaction, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

with Lys369 is disappeared for the 2C derivative, and many tau residues interact weakly with 2C. Fig. 5c reveals that the central oxygen atom and the hydroxyl group form hydrogen bonds with Lys353 and Gly334, respectively.

By changing the position of the methoxy group on the phenol ring of 2C, the structure of 3A is obtained as shown in Fig. 1d. It is noted that 3A has strong attractive interactions with Hip362 and Lys369, as shown in Fig. 4d. These interactions are found to come from the strong hydrogen bonds between the central oxygen atoms and these tau residues as indicated in Fig. 5d. In addition, the phenol ring of 3A has CH-π and electrostatic interactions with Thr361.

By replacing the hydroxyl group on the phenol ring of 3A with 2-pyridinemethanol, 3E structure is obtained. Fig. 4e indicates that the strong attractive interactions with the charged residues Hip362 and Lys369 of tau protein for the 3A derivative are significantly reduced for the tau+3E complex. On the other hand, 3E interacts with Hip330 and Asp358. Fig. 5e elucidates that the sidechains of these tau residues form hydrogen bonds with 3E.

PE859 was obtained by replacing the central β-diketone group of 3E with a pyrazole group, and PE859 was found to have strong

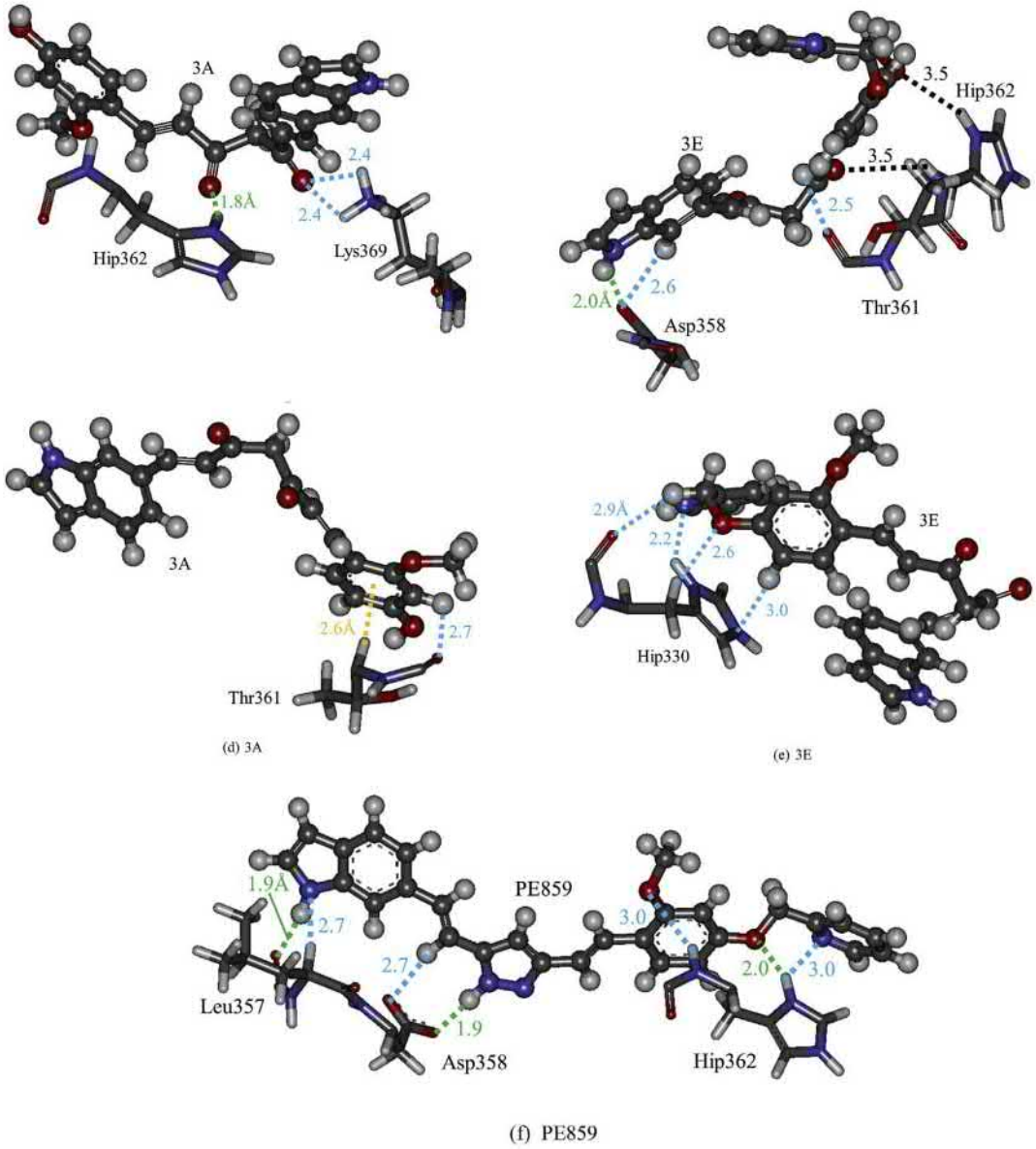


Fig. 5. (*continued*).

attractive interactions with Hip362, Asp358 and Leu357 residues, as shown in Fig. 4f. Each of these residues has a strong hydrogen bond with PE859 at different sites shown in Fig. 5f. It is noted that the NH site of the central pyrazole group form a strong hydrogen bond with the terminal COO group of Asp358.

PE859 can have a different structure from the other derivatives, because of the central pyrazole group of PE859. As shown in Fig. 5f, PE859 has an almost straight structure in the ligand-binding pocket of tau protein, whereas the other derivatives have bended structures. To elucidate the effect of the pyrazole group of PE859, we compared the IFIEs between the derivative and each of tau residues for the tau + PE859 and tau+3E complexes. Fig. 6 shows the difference in the IFIEs for the both complexes, indicating that PE859 interacts more strongly with Hip362 and Leu357, compared with 3E. In fact, Fig. 5f reveals that PE859 can form three hydrogen bonds with Asp358, Hip362 and Leu357 at the different sites of PE859. Because PE859 has a straight structure, such multiple interactions can be possible. It is thus expected that the central pyrazole group of PE859 can make PE859 more straight structure, which can bind strongly with many tau residues, as indicated in Fig. 5f. In contrast, the other curcumin derivatives as well as curcumin prefer to have bended structures in the ligand-binding pocket of tau protein. In fact, Fig. 5a clearly indicates that curcumin has a structure bended at the central β-diketone site, so that only the hydroxyl groups on the both sides can form hydrogen bonds with tau residues.

Finally, we attempted to propose more potent inhibitors against

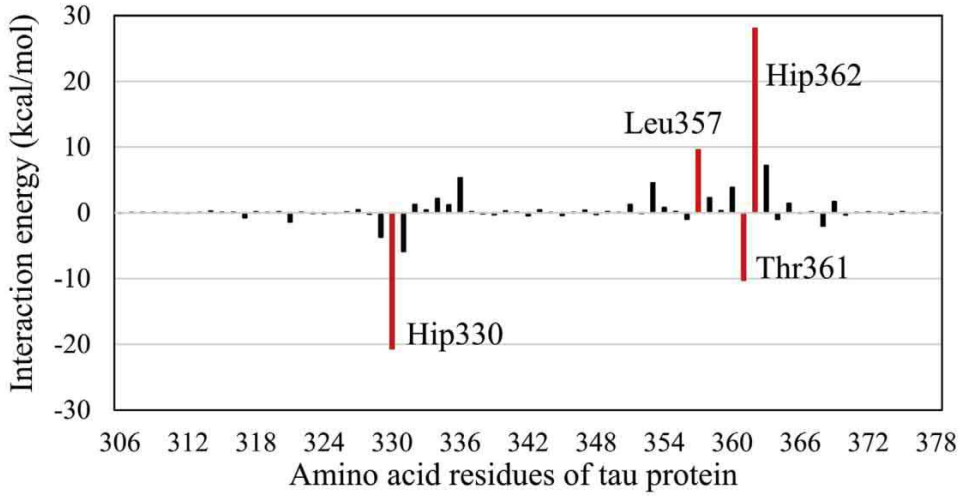


Fig. 6. Difference in interaction energies between each amino acid residue of tau protein and curcumin derivative for the tau+3E and the tau + PE859 complexes. Red lines indicate the residues with the difference in energy larger than 10 kcal/mol with derivative. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

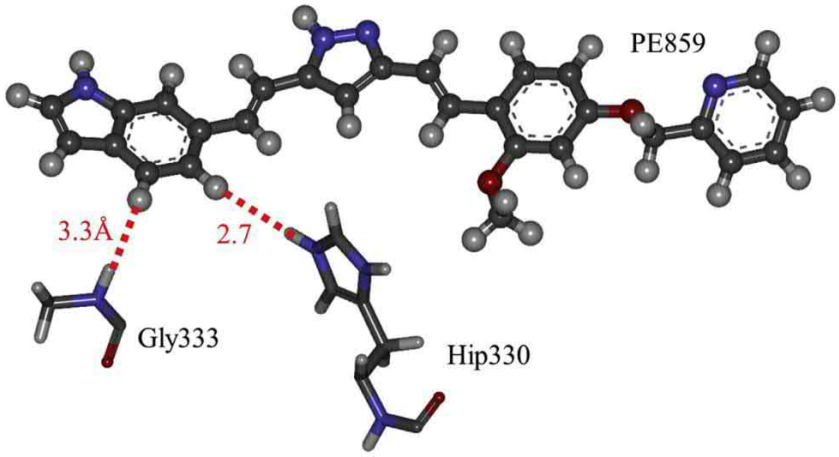


Fig. 7. Distances between PE859 and some amino acid residues of tau protein, which can form attractive interaction with PE859 by modifying the PE859 structure.

the aggregation of tau proteins based on the PE859 structure, because it has the lowest BE to tau protein. It is elucidated from Fig. 4e and f that the interaction between the 3E derivative and Hip330 is significantly reduced by introducing the central pyrazole group into 3E. To reveal the reason for this reduction, we investigated the structure around PE859 in the tau + PE859 complex. As shown in Fig. 7, Hip330 sidechain is a little (2.7 Å) away from the indole ring of PE859. Therefore, it is expected that the interaction between PE859 and Hip330 can be enhanced by introducing a hydroxyl group into the 4-site of the indole ring of PE859. It is also found that the backbone NH group of Gly333 exists near the 5-site of the indole ring, so that the 5-hydroxyindole group for PE859 can have strong interaction with Gly333. The chemical structures of these proposed derivatives are shown in Fig. S2 of the supplementary information. Such modifications of the indole ring of PE859 have a possibility of enhancing the interactions with tau protein.

4. Conclusions

In the present study, we investigated the specific interactions between tau protein and curcumin derivatives at an electronic level, using protein-ligand docking simulations, MM optimizations and *ab initio* FMO calculations. The results are summarised as follows.

(1) PE859 has the lowest BE among the derivatives investigated in this study.
(2) Because of a pyrazole group at the center of PE859, it has a straight structure and binds more strongly with many residues of tau protein.
(3) Modification of the indole ring of PE859 has a possibility of enhancing its interaction with tau protein.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This collaboration study was carried out under the official agreement of international collaboration study between Toyohashi University of Technology and the National Academy of Sciences of Ukraine. This study was supported by the international internship program of Japan Student Services Organization (JASSO) and The Nitto Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107611.

References

[1] M. Okuda, I. Hijikuro, Y. Fujita, T. Teruya, H. Kawakami, T. Takahashi, H. Sugimoto, Design and synthesis of curcumin derivatives as tau and amyloid β dual aggregation inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett 26 (2016) 5024–5028.
[2] A.W.P. Fitzpatrick, B. Falcon, S. He, A.G. Murzin, G. Murshudov, H.J. Garringer, R.A. Crowther, B. Ghetti, M. Goedert, S.H.W. Scheres, Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease, Nature 547 (2017) 185–190.
[3] L. Martin, X. Latypova, F. Terro, Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease, Neurochem. Int. 58 (2011) 458–471.
[4] V. Furlan, J. Konc, U. Bren, Inverse molecular docking as a novel approach to study anticarcinogenic and anti-neuroinflammatory effects of curcumin, Molecules 23 (2018) 3351–3369.
[5] G. Liang, L. Shao, Y. Wang, C. Zhao, Y. Chu, J. Xiao, Y. Zhao, X. Li, S. Yang, Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 2623–2631.
[6] C.R. Søndergaard, M.H.M. Olsson, M. Rostkowski, J.H. Jensen, Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa Values, J. Chem. Theor. Comput. 7 (2011) 2284–2295.
[7] M.H.M. Olsson, C.R. Søndergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, J. Chem. Theor. Comput. 7 (2011) 525–537.
[8] P.A.K.D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, D. Ghoreishi, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, D. Greene, R. Harris, N. Homeyer, S. Izadi, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGra, AMBER 2018, Univ. California, San Francisco, 2018.
[9] J.A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB, J. Chem. Theor. Comput. 11 (2015) 3696–3713.
[10] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, J. Chem. Phys. 79 (1983) 926–935.
[11] M.J. Frisch, et al., Gaussian 16, Revision C.01, Inc., Wallingford CT, 2016.
[12] C.I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P.A. Kollman, A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, J. Phys. Chem. 97 (1993) 10269–10280.
[13] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[14] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[15] K. Kitaura, E. Ikeo, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayashi, Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules, Chem. Phys. Lett. 313 (1999) 701–706.
[16] Y. Mochizuki, T. Nakano, S. Koikegami, S. Tanimori, Y. Abe, U. Nagashima, K. Kitaura, A parallelized integral-direct second-order Muller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 112 (2004) 442–452.
[17] Y. Mochizuki, S. Koikegami, T. Nakano, S. Amari, K. Kitaura, Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme, Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 473–479.
[18] Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, N. Taguchi, S. Tanaka, Higher-order correlated calculations based on fragment molecular orbital scheme, Theor. Chem. Acc. 130 (2011) 515–530.
[19] K. Fukuzawa, Y. Komeiji, Y. Mochizuki, A. Kato, T. Nakano, S. Tanaka, Intra- and inter-molecular interactions between cyclic-AMP receptor protein and DNA: *Ab initio* fragment molecular orbital study, J. Comput. Chem. 27 (2006) 948–960.
[20] U. Bren, V. Martínek, J. Florián, Decomposition of the solvation free energies of deoxyribonucleoside triphosphates using the free energy perturbation method, Phys. Chem. B110 (2006) 12782–12788.
[21] M. Bren, J. Florián, J. Mavri, U. Bren, Do all pieces make a whole? Thiele cumulants and the free energy decomposition, Theor. Chem. Acc. 117 (2007) 535–540.

5.5 Вплив Аβ (42) на динаміку експресії та утворення Аβ (40), IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 у мононуклеарах і когнітивні характеристики щурів із моделлю хвороби Альцгеймера та його корекція куркуміном

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 3

UDC 616.894–092:615.3 doi: http://dx.doi.org/10.15407/ubj88.03.083

EFFECT OF CURCUMIN ON ACCUMULATION IN MONONUCLEAR CELLS AND SECRETION IN INCUBATION MEDIUM OF $A\beta_{40}$ AND CYTOKINES UNDER LOCAL EXCESS OF $A\beta_{42}$-HOMOAGGREGATES

V. V. SOKOLIK[1], S. M. SHULGA[2]

[1]SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of NAMS of Ukraine", Kharkiv;
[2]SI "Institute for Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine", Kyiv;
e-mail: sokolik67@rambler.ru

The aim of the work was to investigate accumulation of endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in mononuclear cells and their secretion into incubation medium under $A\beta_{42}$-aggregates' toxicity and anti-inflammatory effects of curcumin. Mononuclear cells were isolated in Ficoll-Urografin density gradient from venous blood of healthy donors, resuspended and used for testing of homoaggregates of $A\beta_{42}$ (15 nM), curcumin (54 pM) and their combinations on various timescales (0, 1, 2, 3, 6 and 24 hours). Endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines were detected in mononuclear cells and (separately) in incubation medium by ELISA. We demonstrated for the first time that homoaggregates of $A\beta_{42}$ cause rapid accumulation of endogenous $A\beta_{40}$ in mononuclear cells and accelerate its secretion into incubation medium. We found increased concentration of TNFα after 3 hours of incubation, and no changes in IL-1β concentration due to secretion of these pro-inflammatory factors into incubation medium. The concentrations of IL-6 in mononuclear cells were increased under effects of $A\beta_{42}$ homoaggregates, and it was being secreted profoundly into incubation medium. $A\beta_{42}$ did not affect IL-10 secretion, yet caused an increase in its intracellular concentration after 1 hour of incubation, which was subsequently suppressed. Curcumin prevented the increase in $A\beta_{40}$ concentration in mononuclear cells and significantly decreased its secretion resulting from $A\beta_{42}$ toxicity. Curcumin negated the activating effect of $A\beta_{42}$ on pro-inflammatory cytokines, starting immediately for IL-1β and on 3-6 hours for TNFα, which resulted in decreased extracellular concentrations of these cytokines. The polyphenol also potentiated replenishing of intracellular IL-6 and IL-10 concentrations and their secretion into incubation medium.

K e y w o r d s: curcumin, β-amyloid peptides 40 and 42 ($A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$), cytokines, secretion, human peripheral blood mononuclear cells.

Alzheimer's disease is the primary cause of senile dementia associated with amyloid-β peptides (Aβ), oligomers and aggregates of which exert toxic and destructive effects upon neural tissue [1-5]. Nevertheless, there is no clear evidence of the agent that provokes increased synthesis of amyloid-β precursor protein (AβPP) and the switch in its processing towards amyloid pathway followed by local accumulation of Aβ. Aβ is generally considered to be a toxic molecular waste product [6-8]. Yet recent studies have demonstrated trophic [9] properties of AβPP (antimicrobial, in particular), that served as basis for its comparison with other antimicrobial peptides (defensins, histatins, and cathelicidins) and attribution to brain's innate immune system [10]. We have proved [11] the role of chronic inflammation in initiation of amyloidosis, and the involvement of cytokines and Aβ in inflammatory response to toxic effects of Aβ-aggregates.

The variable dynamics of Aβ ($A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$) in blood serum and cerebrospinal fluid of patients with amyloidosis has been demonstrated [12, 13]. The Aβ-levels in peripheral blood flow were highly increased during initial asymptomatic stages of amyloid-associated pathology, on the other hand $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ levels in patients during neurodegenerative stages of the Alzheimer's disease were within or even below normal margins [14, 15]. The presence of these neuropeptides in biological fluids was attributed to Aβ accumulation in certain parts of brain (hippocampus, frontal cortex, and olfactory bulbs) and to increased permeability of blood-brain barrier due to inflammation [16, 17]. In contrast, we have established [18] that AβPP expression and its

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 3

amyloidogenic processing in human peripheral blood mononuclear cells is activated in response to $A\beta_{42}$ effects and leads to $A\beta_{40}$ accumulation regardless of neural tissue. One of the aims of the present work was to establish the possibility of secretion of $A\beta_{40}$ produced by peripheral mononuclear cells into surrounding medium, which could be used as its indicator in biological fluids of patients with Alzheimer disease and of its function other than being an amyloidohenesis.

Another standing problem is finding approaches to eliminate causes for AβPP overexpression and amyloidogenic processing, and inhibiting the inflammation resulting from Aβ-aggregate toxicity. We have demonstrated curcumin efficiency as a regulator of cytokine-dependent inflammation *in vivo* and *in vitro* [18-20]. Therefore it was sensible to investigate the effect of curcumin on accumulation and secretion of endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines by mononuclear cells of human peripheral blood in vitro under $A\beta_{42}$ aggregates' toxicity.

Materials and Methods

The experiments were conducted in accordance with provisions of the Universal Declaration on Bioethics and Human Rights (UNESCO, 2005).

Peripheral blood mononuclear cells were isolated ex tempore in Ficoll-Urografin density gradient from venous blood samples of three healthy donors (separately). The cells were washed thrice with sterile normal saline at room temperature and resuspended in RPMI medium in aliquots of 2×10^6 cells/ml. The resulting samples (n = 3) were subjected to $A\beta_{42}$ (15 nM), curcumin (54 pM) and their combination (with the same concentrations) at various timeframes. The ratio of volumes of effectors to cell suspension was 1:100.

$A\beta_{42}$_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in double-distilled water and aggregated for 24 h at 37 °C. Large crude $A\beta_{42}$ agglomerates were disintegrated by ultrasound and sterilized prior to application.

As curcumin is water-insoluble, the primary solution was first dissolved in 96% ethanol and then diluted to 0.7 g/l immediately prior to addition to cell suspension.

The effect of $A\beta_{42}$ and 0.9% NaCl on mononuclear cells was investigated in 0-, 1-, 2-, 3-, 6-, and 24-hour incubation experiments at 37 °C and 600 rpm mix. The effects of curcumin alone and curcumin combined with $A\beta_{42}$ were investigated in 2-, 3-, 6-, and 24-hour experiments under the same conditions; curcumin was added after 1 hour incubation with $A\beta_{42}$ or normal saline (0.9% NaCl). Cells were sampled at the mentioned time points (2×10^6 cells/ml), sedimented by centrifugation and disintegrated by ultrasound (MUSSON-1 ultrasound inhalator, 3 min treatment at 2.64 MHz wavelength and 0.25 W/cm^3 intensity) the samples were then centrifuged at 6000 rpm for 20 min. Cell supernatant and incubation medium aliquots were used for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Concentrations of endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines were estimated by ELISA in accordance with kit manuals (Vektor-Best, Russia) for IL-1β, IL-6, IL-10, and TNFα, and *ELISA Kit Human* $A\beta_{40}$ (Invitrogen, USA). Absorptions were measured with GBG STAT-FAX 2100 (USA) at 450 nm and correction at 630 nm. The results were calculated against total protein concentration (ng/g of protein) measured by Lowry method [21].

Mean values and standard deviations were determined for the indicators of mononuclear cells suspension. The statistical analysis was performed with Student's t-test, the differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Study of $A\beta_{42}$ and curcumin's effects on inflammation dynamics in suspension of mononuclear cells include *in vitro* determination of intracellular accumulation of $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, and IL-10) and their secretion into incubation medium. The results (Fig. 1) demonstrate a 2-fold increase in endogenous $A\beta_{40}$ concentration under incubation of mononuclear cells with normal saline or curcumin for 6 h, which is non-specific and may be explained by a spontaneous flux in expression or processing of AβPP [18]. $A\beta_{42}$ homoaggregates caused 7.7-fold increase in $A\beta_{40}$ concentration in mononuclear cells and activation of its secretion on the 1st h of incubation. The described [18] early and rapid activation of AβPP processing in mononuclear cells under $A\beta_{42}$ toxicity led to notable increase of intracellular $A\beta_{40}$ levels as well as to forced secretion of this mediator of inflammation into incubation medium.

The intracellular $A\beta_{40}$ concentration then gradually decreased for 6-24 hours, but did not recede to the starting levels (0 hour) or the levels in mononuclear cells incubated with normal saline for

24 h. Beginning at 6th h of incubation with $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$ secretion was increased 2-fold and remained elevated afterwards (Fig. 1).

Curcumin had no effect upon $A\beta_{40}$ concentration in suspension of mononuclear cells in comparison with the dynamics displayed by cells incubated with normal saline. Nevertheless, it noticeably inhibited the increase in $A\beta_{40}$ intracellular concentration and secretion caused by $A\beta_{42}$ (Fig. 1). The inhibiting effect of curcumin upon $A\beta_{40}$ production is due to its ability to downregulate GSK-3β mediated activation of presenilin-1 (PS-1) [22]. PS-1 participates in γ-secretase enzyme complex, which takes part in AβPP processing, and is a GSK-3β substrate. The latter modulates γ-secretase activity through phosphorylation of serine in PS-1 loop domain [23]. Curcumin has been demonstrated to increase the proportion of inactivated (Ser9-phosphorylated) GSK-3β form depending on concentration and duration of exposure, and also to inhibit expression of *PS1* and *GSK-3β* genes [22]. These factors lead to diminished Aβ production. Our data are in accordance with the results by others who investigate curcumin effects on the model of Aβ-induced inflammation of primary astrocytes [24] and mouse cortical neurons culture [25].

Thus, $A\beta_{42}$ homoaggregates induced accumulation of endogenous $A\beta_{40}$ in mononuclear cells and stimulated secretion of this pro-inflammatory factor into incubation medium. Curcumin served to substantially prevent the $A\beta_{40}$ cellular concentration increase and significantly decreased its secretion associated with toxic effects of exogenous $A\beta_{42}$.

We observed a noticeable increase in TNFα concentration in mononuclear cells and its secretion under effect of mere normal saline, with the maximum effect on 6th h of exposure (Fig. 2). Unlike the TNFα dynamics, the levels of IL-1β under effects of normal saline fluctuated somewhat close to the baseline. The significant decrease was measured on the 1st and 24th h in cells, and the secretion was registered beginning with the 3rd h of exposure (Fig. 3). We attribute these fluctuations in levels of cytokines to spontaneous activation of mononuclear cells due to isolation-associated stress.

Mononuclear cells are known to principally bear the precursors of pro-inflammatory cytokines (pro-IL-1β and pro-TNFα). The active form of IL-1β is produced by caspase 1 [26], and the active form of TNFα by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE), and the products are rapidly secreted into extracellular matrix. TACE also cleaves AβPP within Aβ membrane domain, thus inhibiting production of β-amyloid peptides [28]. The extracellular IL-1β that had not bound to its receptors (IL1R1 and IL1R2) is degraded by matrix metalloproteinases (MMPs): MMP-1, MMP-2, MMP-3, and MMP-9 [29]. The secreted TNFα binds to the corresponding receptors (TNFR1 and TNFR2) [30].

We noted an increase of TNFα concentration in mononuclear cells (beginning with the 3rd h of exposure) and incubation medium (beginning with the

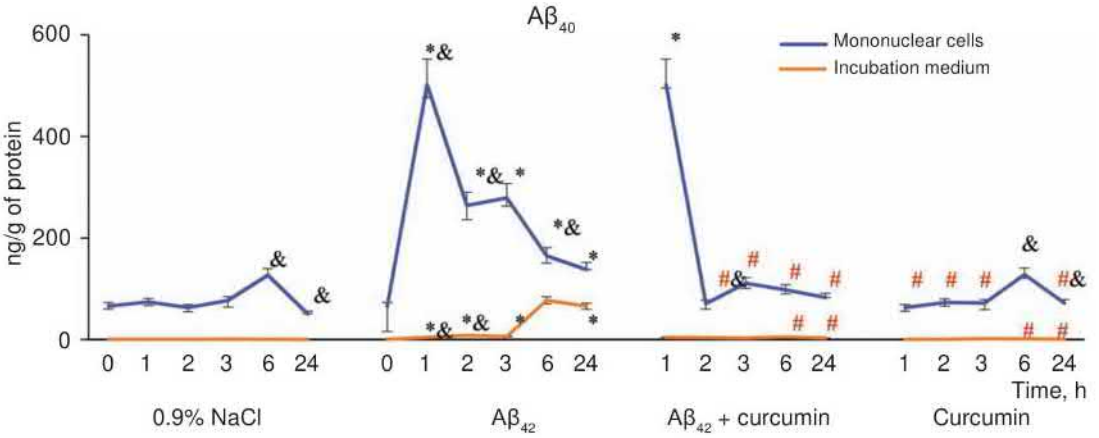


*Fig. 1. $A\beta_{40}$ content in mononuclear cells and incubation medium under effect of normal saline, $A\beta_{42}$, curcumin, and their combination. * Denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to normal saline effect; # denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to $A\beta_{42}$ effect; & denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to the preceding time point*

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 3

6th h of exposure) as a specific response to the effects of $A\beta_{42}$ homoaggregates (Fig. 2). Curcumin alleviated this effect of $A\beta_{42}$ within 3 to 6 hours. TNFα levels in mononuclear cells exposed to curcumin alone resembled those of normal saline-exposed cells. These results confirm that curcumin inhibits only the $A\beta_{42}$-induced accumulation of TNFα, and does not affect its spontaneous production.

Curcumin effect on IL-1β concentration after 1-h incubation with $A\beta_{42}$ was apparent on the 1st h of the polyphenol's effect (2 h, Fig. 3). Its total concentration was 33% lower. During subsequent incubation of mononuclear cells with $A\beta_{42}$ and curcumin the IL-1β levels did not differ from the basic ones (Fig. 3), which is probably due to the fact that curcumin has no effect on caspase 1 [31].

We observed increased secretion of the pro-inflammatory cytokines in incubation medium for the duration of incubation (up to 24 h) beginning from the 1st h of exposure for IL-1β and from the 3rd h for TNFα (Fig. 2 and 3) in response to all the effectors and their combination.

Thus, *in vitro* incubation of mononuclear cells with exogenous $A\beta_{42}$ leads to elevated intracellular concentration of TNFα (on the 3rd h of incubation), but not to accumulation of IL-1β in cells, which served to potentiate the release of these cytokines into incubation medium. Curcumin addition alleviated this effect of $A\beta_{42}$ upon cellular concentrations of the pro-inflammatory cytokines, beginning immediately for Il-1β and from 3 to 6 hours for TNFα, which led to their diminished extracellular concentrations.

The dynamics of IL-6 content in mononuclear cells incubated with normal saline (Fig. 4) generally follows that of TNFα, with the exception that intracellular IL-6 level dropped 3.6-fold immediately and then gradually increased towards starting values for 6-24 h, while TNFα content in mononuclear cells increased twofold from the 1st h of incubation and was 4.8 times higher than the starting value after 6 hours. IL-6 secretion into incubation medium was detected at 6-24 h (Fig 4), which differs substantially from the rapid excretion of the pro-inflammatory cytokines of the initial wave of cytokine system: TNFα (beginning with the 1st h) and IL-1β (beginning with the 3rd h).

Exposure to $A\beta_{42}$ homoaggregates, curcumin, or both caused immediate decrease in intracellular concentrations of IL-6 followed by restoration on the 3rd h of incubation. Curcumin subsequently caused gradual increase in accumulation and secretion of the cytokine, and $A\beta_{42}$ homoaggregates caused its decreased accumulation and increased secretion (Fig. 4). Therefore, we established increase in intracellular levels of IL-6 and activation of its secretion into incubation medium under influence of all the tested effectors. The effect of curcumin was substantial on the 24th h of exposure. These data are not in discrepancy with the evidence of the inhibitive

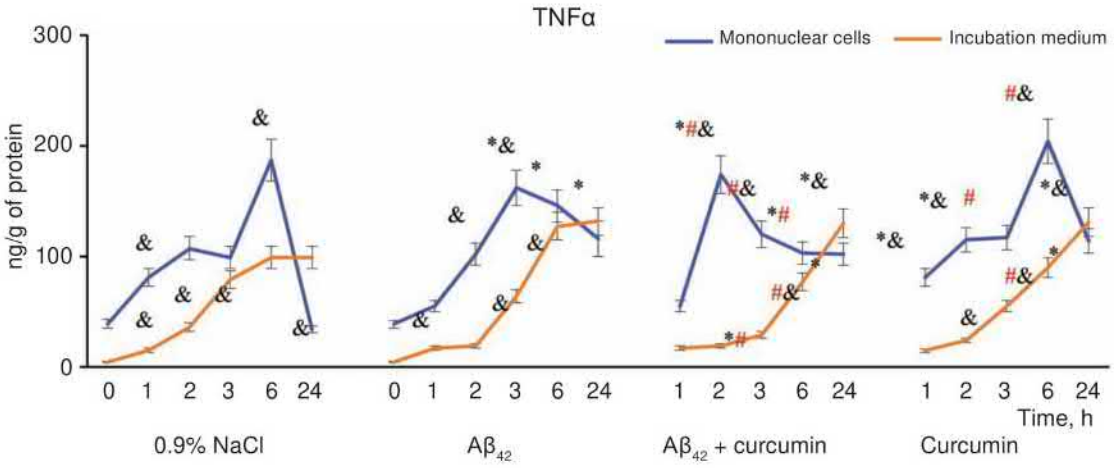


Fig. 2. TNFα content in mononuclear cells and incubation medium under effect of normal saline, $A\beta_{42}$, curcumin, and their combination. Denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to normal saline effect; # denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to $A\beta_{42}$ effect; & denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to the preceding time point*

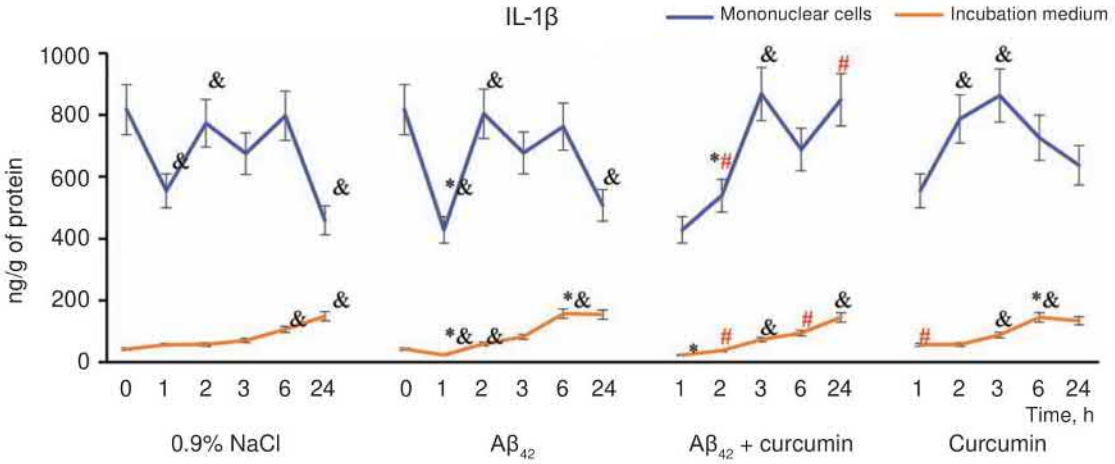


*Fig. 3. IL-1β content in mononuclear cells and incubation medium under effect of normal saline, $A\beta_{42}$, curcumin, and their combination. * Denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to normal saline effect; # denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to $A\beta_{42}$ effect; & denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to the preceding time point*

effects of curcumin on the activation of pro-inflammatory cytokines [32, 33].

$A\beta_{42}$ did not affect IL-10 secretion, yet caused increase in its intracellular concentration after 1 h exposure, with subsequent inhibition of accumulation in cells (Fig. 5). Curcumin addition after 1-h exposure to $A\beta_{42}$ homoaggregates restored intracellular levels of the anti-inflammatory interleukin on 6-24 h of incubation *in vitro*. Curcumin alone caused gradual elevation in intracellular IL-10 content (1-3 h) with increased excretion in incubation medium on 6-24 h (Fig. 5).

These data corroborate our previous results indicating that IL-10 expression is not induced in mononuclear cells under effect of exogenous $A\beta_{42}$, and that concentration of iRNA of IL-10 is increased under effect of curcumin [18]. Others have proven the positive effects of curcumin upon IL-10 expres-

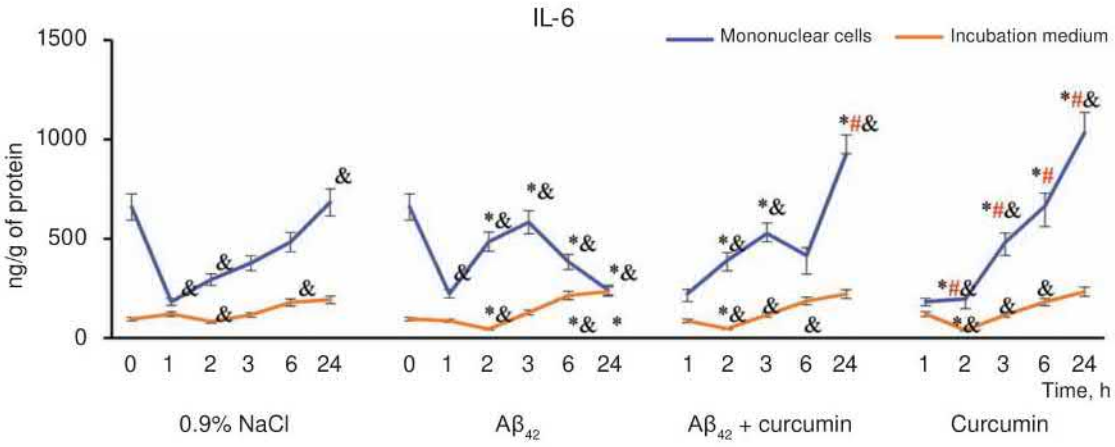


*Fig. 4. IL-6 content in mononuclear cells and incubation medium under effect of normal saline, $A\beta_{42}$, curcumin, and their combination. * Denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to normal saline effect; # denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to $A\beta_{42}$ effect; & denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to the preceding time point*

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 3

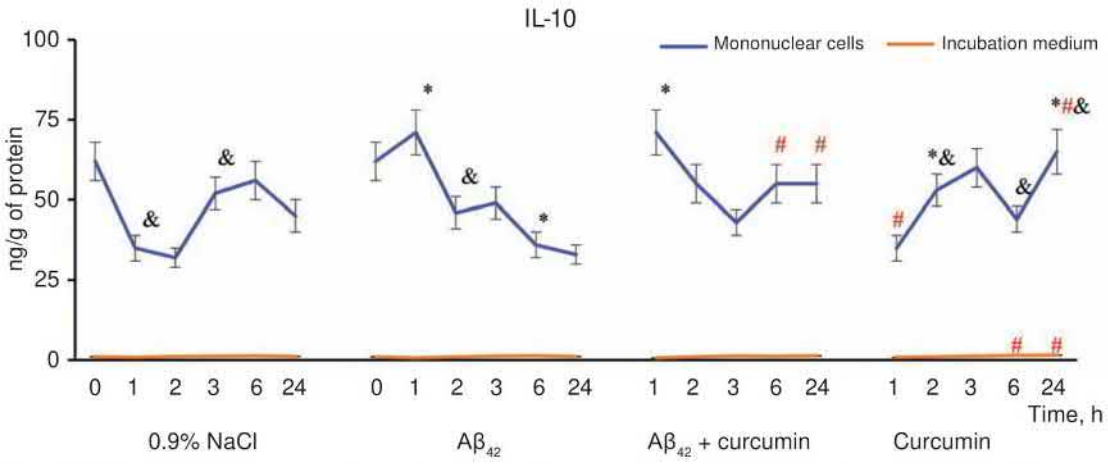


*Fig. 5. IL-10 content in mononuclear cells and incubation medium under effect of normal saline, $A\beta_{42}$, curcumin, and their combination. * Denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to normal saline effect; # denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to $A\beta_{42}$ effect; & denotes changes with $P < 0.05$ in comparison to the preceding time point*

sion [34, 35], and attributed these *in vivo* effects to inhibition of p38 activity through suppression of its phosphorylation.

Therefore, we hereby establish the capability of mononuclear cells to produce and secrete endogenous $A\beta_{40}$, which indicates its peripheral origin if detected in blood flow. We also demonstrate the non-amyloidogenic function of $A\beta_{40}$ as a pro-inflammatory messenger responsive to effects of $A\beta_{42}$ homoaggregates. We observed for the first time that curcumin prevented increase in $A\beta_{40}$ intracellular concentrations and significantly decreased its secretion under effects of exogenous $A\beta_{42}$. We show the particularities in dynamics of accumulation and secretion by mononuclear cells of the investigated cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, and IL-10) under toxic effects of $A\beta_{42}$ aggregates and anti-inflammatory influence of curcumin.

ВПЛИВ КУРКУМІНУ НА НАКОПИЧЕННЯ В МОНОНУКЛЕАРАХ І НА СЕКРЕЦІЮ В ІНКУБАЦІЙНЕ СЕРЕДОВИЩЕ $Aβ_{40}$ ТА ЦИТОКІНІВ В УМОВАХ ЛОКАЛЬНОГО НАДЛИШКУ ГОМОАГРЕГАТІВ $Aβ_{42}$

В. В. Соколік[1], С. М. Шульга[2]

[1]ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України», Харків;
[2]ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ;
e-mail: sokolik67@rambler.ru

Метою дослідження було вивчення накопичення в мононуклеарах і секреції до інкубаційного середовища ендогенного $Aβ_{40}$ і цитокінів (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) в умовах токсичного впливу $Aβ_{42}$-агрегатів та антизапального ефекту куркуміну. Суспензію мононуклеарних клітин, ізольованих за допомогою фіколурографінового градієнта зі зразків венозної крові здорових добровольців, використовували для дослідження впливу гомоагрегатів $Aβ_{42}$ (15 нМ), куркуміну (54 пМ) та їх поєднаній дії в динаміці часу (0, 1, 2, 3, 6 і 24 год). Методом імуноензимного аналізу вимірювали вміст ендогенного $Aβ_{40}$ і цитокінів окремо в мононуклеарах і в інкубаційному середовищі. Вперше показано, що гомоагрегати $Aβ_{42}$ обумовлюють швидке накопичення ендогенного $Aβ_{40}$ в мононуклеарах та прискорюють його секрецію до інкубаційного середовища. Встановлено збільшення концентрації TNFα (через 3 год інкубації) і відсутність накопичення IL-1β в клітинах завдяки істотній секреції цих запальних месенджерів до інкубаційного середовища. Виявлено збільшення мононуклеарного пулу IL-6 і активацію його секреції до інкубаційного середовища за дії $Aβ_{42}$-гомоагрегатів. $Aβ_{42}$ не впливав на секрецію IL-10, але обумовлював збільшення його внутрішньоклітинної концентрації через 1 год інкубації з наступним пригніченням клітинного накопичення. Додавання куркуміну запобігало збільшенню концентрації $Aβ_{40}$ в мононуклеарах та вірогідно зменшувало його секрецію, обумовлену токсичним впливом екзогенного $Aβ_{42}$ на клітини. Куркумін знімав активуючий ефект $Aβ_{42}$ на мононуклеарний пул запальних цитокінів: з перших годин дії для IL-1β та в часовому інтервалі 3–6 год для TNFα, що позначилося зменшенням позаклітинного пулу обох цитокінів. Цей поліфенол також сприяв відновленню внутрішньоклітинного пулу IL-6 і IL-10 та позитивно впливав на їх секрецію до інкубаційного середовища.

Ключові слова: куркумін, β-амілоїдні пептиди – 40 і 42 ($Aβ_{40}$, $Aβ_{42}$), цитокіни, секреція, мононуклеари периферійної крові людини.

ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА НА НАКОПЛЕНИЕ В МОНОНУКЛЕАРАХ И НА СЕКРЕЦИЮ В ИНКУБАЦИОННУЮ СРЕДУ $Aβ_{40}$ И ЦИТОКИНОВ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО ИЗБЫТКА ГОМОАГРЕГАТОВ $Aβ_{42}$

В. В. Соколик[1], С. М. Шульга[2]

[1]ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков;
[2]ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев;
e-mail: sokolik67@rambler.ru

Целью исследования было изучение накопления в мононуклеарах и секреции из них в инкубационную среду эндогенного $Aβ_{40}$ и цитокинов (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) в условиях токсического действия $Aβ_{42}$-агрегатов и антивоспалительного эффекта куркумина. Суспензию мононуклеарных клеток, изолированных с помощью фиколл-урографинового градиента из образцов венозной крови здоровых добровольцев, использовали для исследования влияния гомоагрегатов $Aβ_{42}$ (15 нМ), куркумина (54 пМ) и их сочетанного действия во временной динамике (0, 1, 2, 3, 6 и 24 ч). Методом иммуноэнзимного анализа измеряли содержание эндогенного $Aβ_{40}$ и цитокинов отдельно в мононуклеарах крови человека и в инкубационной среде. Впервые показано, что гомоагрегаты $Aβ_{42}$ обусловливают быстрое накопление эндогенного $Aβ_{40}$ в мононуклеарах и ускоряют его секрецию в инкубационную среду. Установлено увеличение внутриклеточной концентрации TNFα (через 3 ч инкубации) и отсутствие накопления IL-1β в клетках вследствие существенной секреции этих воспалительных мессенджеров в инкубационную среду. Показано увеличение мононуклеарного пула IL-6 и активация его секреции в инкубацинную среду под действием

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 3

$A\beta_{42}$-гомоагрегатов. $A\beta_{42}$ не влиял на секрецию IL-10, хотя и обусловливал увеличение его внутриклеточной концентрации через 1 ч инкубации с последующим угнетением накопления в клетках. Добавление куркумина предотвращало увеличение концентрации $A\beta_{40}$ в клетках и достоверно уменьшало его секрецию, обусловленную токсическим действием экзогенного $A\beta_{42}$. Куркумин снимал активирующий эффект $A\beta_{42}$ на мононуклеарный пул воспалительных цитокинов: с первых часов действия для IL-1β и в интервале времени 3–6 ч для TNFα, что отразилось на уменьшении внеклеточного пула обоих цитокинов. Этот полифенол также способствовал восстановлению внутриклеточного пула IL-6 и IL-10 и положительно влиял на их секрецию в инкубационную среду.

Ключевые слова: куркумин, β-амилоидные пептиды 40 и 42 ($A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$), цитокины, секреция, мононуклеары периферической крови человека.

References

1. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.* 2012; 65: 329-352.
2. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(6): 1261-1268.
3. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, Mahmoudi J. Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract.* 2015; 24(1): 1-10.
4. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 924: 17-25.
5. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010; 362(4): 329-344.
6. Crouch PJ, Harding SM, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL. Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(2): 181-198.
7. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(2): 101-112.
8. Yankner BA, Lu T. Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2009 Feb 20;284(8):4755-4759.
9. Pearson HA, Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol.* 2006; 575(Pt 1): 5-10.
10. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 2010; 5(3): e9505.
11. Sokolik VV, Maltsev AV. Cytokines neuroinflammatory reaction to the action of homoaggregatic and liposomal forms of b-amyloid 1-40 in rats. *Biomed Khim.* 2015; 61(3): 373-380. (In Russian).
12. Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2000; 57(1): 100-105.
13. Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, Patton RL, Luehrs DC, Daugs ID, Kuo YM, Emmerling MR, Soares H, Quinn JF, Kaye J, Connor DJ, Silverberg NB, Adler CH, Seward JD, Beach TG, Sabbagh MN. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2009; 5(1): 18-29.
14. Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ. Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther.* 2013; 5(2): 8.
15. Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K. Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(3): 357-367.
16. Le Bastard N, Leurs J, Blomme W, De Deyn PP, Engelborghs S. Plasma amyloid-beta forms in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2010; 21(1): 291-301.
17. Boutajangout A, Wisniewski T. The innate immune system in Alzheimer's disease. *Int J Cell Biol.* 2013; 2013: 576383.

18. Sokolik VV, Koliada OK, Shulga SM. Effect of β-amyloid peptide 42 on the dynamics of expression and formation of Aβ40, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 by peripheral blood mononuclear cells in vitro and its correction by curcumin. *Ukr Biochem J.* 2016; 88(1): 109-118.
19. Sokolik VV, Shulga SM. Influence of curcumin on cytokines content and angiotensin-converting activity under intrahippocampus administration of β-amyloid peptide in rats. *Biotechnologia Acta.* 2015; 8(3): 78-88.
20. Sokolik VV, Shulga SM. Effect of curcumin liposomal form on angiotensin converting activity, cytokines and cognitive characteristics of the rats with Alzheimer's disease model. *Biotechnologia Acta.* 2015; 8(6): 48-55.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-275.
22. Xiong Z, Hongmei Z, Lu S, Yu L. Curcumin mediates presenilin-1 activity to reduce β-amyloid production in a model of Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rep.* 2011; 63(5): 1101-1108.
23. Twomey C, McCarthy JV. Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3beta substrate. *FEBS Lett.* 2006; 580(17): 4015-4020.
24. Wang HM, Zhao YX, Zhang S, Liu GD, Kang WY, Tang HD, Ding JQ, Chen SD. PPARgamma agonist curcumin reduces the amyloid-beta-stimulated inflammatory responses in primary astrocytes. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20(4): 1189-1199.
25. Zhang C, Browne A, Child D, Tanzi RE. Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem.* 2010; 285(37): 28472-28480.
26. Tocci MJ. Structure and function of interleukin-1 beta converting enzyme. *Vitam Horm.* 1997; 53: 27-63.
27. Lu XJ, Chen Q, Yang GJ, Chen J. The TNFα converting enzyme (TACE) from ayu (Plecoglossus altivelis) exhibits TNFα shedding activity. *Mol Immunol.* 2015; 63(2): 497-504.
28. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000; 113(Pt 11): 1857-1870.
29. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996; 271(25): 14657-14660.
30. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25(4): 453-472.
31. Khar A, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Begum Z, Anjum R. Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. FEBS Lett. 1999; 445(1): 165-168.
32. Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 41-47.
33. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 2009; 14(2): 141-153.
34. Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr.* 2010; 103(6): 824-832.
35. Song WB, Wang YY, Meng FS, Zhang QH, Zeng JY, Xiao LP, Yu XP, Peng DD, Su L, Xiao B, Zhang ZS. Curcumin protects intestinal mucosal barrier function of rat enteritis via activation of MKP-1 and attenuation of p38 and NF-κB activation. *PLoS One.* 2010; 5(9): e12969.

Received 25.04.2016

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 1

UDC 616.894–092:615.3 doi: http://dx.doi.org/10.15407/ubj88.01.109

EFFECT OF β-AMYLOID PEPTIDE 42 ON THE DYNAMICS OF EXPRESSION AND FORMATION OF $A\beta_{40}$, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS *IN VITRO* AND ITS CORRECTION BY CURCUMIN

V. V. SOKOLIK[1], O. K. KOLIADA[2], S. M. SHULGA[3]

[1]SI Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv;
[2]SI D. F. Chebotarev Institute of Gerontology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;
[3]SI Institute for Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: sokolik67@rambler.ru

The toxic effect of Aβ-oligomers accompanies chronic inflammation, with cytokines as main mediators. Therefore, the cytokine link of inflammation becomes a new target on the way to restrain amyloidosis. The aim of the study was the effect of aggregated $A\beta_{42}$ on the dynamics of expression and formation of endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) by peripheral blood mononuclear cells in vitro and its correction by curcumin. A suspension of mononuclear cells isolated ex tempore using ficoll-urografin gradient from venous blood samples of healthy volunteers were used to study the effects of $A\beta_{42}$ (15 nM), curcumin (54 pM), and their combined action (at similar concentrations) in time dynamics: 0, 1, 3, 6 and 24 h incubation at 37 °C. Polymerase chain reaction with appropriate primers was used to determine the relative expression of mRNA for AβPP, TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10 and enzyme-linked immunosorbent assay – to determine the content of $A\beta_{40}$ and cytokines in mononuclear suspension during all periods of incubation. The individual dynamics AβPP and cytokine expression was shown under the action of the $A\beta_{42}$, which had influence on the content of $A\beta_{40}$, TNFα, IL-1β, IL-6 and IL-10 in mononuclear suspension. Curcumin displayed the inhibitory effect on gene expression of AβPP, TNFα and IL6, which resulted in the decrease of the level of these two cytokines and $A\beta_{40}$. Thus, the dynamics of anti-inflammatory effect of curcumin in vitro for transcriptional and translational levels of cytokine's formation by mononuclear cells was shown in the work. Direct inhibitory effect of curcumin on the concentration of endogenous $A\beta_{40}$ during the 24 h incubation in conditions of toxic action of $A\beta_{42}$ aggregates was established.

K e y w o r d s: curcumin, β-amyloid peptides 40 and 42, cytokines, mRNA, human peripheral blood mononuclear cells.

The family of β-amyloid peptides (Aβ) includes peptides with 38-43 amino acid residues (a. r.) being a product of amyloidogenic processing of the precursor protein of β-amyloid peptide (AβPP). Soluble $A\beta_{40}$ in standard conditions performs a trophic function in neurons [1] and only with manifestation of protein conformation disease (amyloidosis) its aggregates acquire toxic properties [2]. The Aβ isoform with 2 additional a. r. at C-end of this peptide (Aβ42) is more aggregation aggressive; the above acid residues increase its hydrophobicity and thus determine high bias towards formation of insoluble fibrils [3]. β-Amyloid peptides acquire toxic properties owing to their own oligomerization. Rather soluble Aβ oligomers than their monomers or insoluble amyloid fibrils are responsible for neurotoxicity and synaptic dysfunction under amyloidosis [4].

The toxic effect of Aβ-system which produces the excessive number of inflammation cytokines – interleukins-1β, -6, -8 (IL-1β, -6, -8), tumor necrosis factor α (TNFα), etc. [5], accompanies the course of chronic inflammatory process, cytokines being its main mediators. Hyperactivity of mononuclear-phagocytic link of the immune system appears as independent motive force of amyloidosis process. It has

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 1

been found out that cytokines affect metabolism of AβPP, activating its synthesis and processing in amyloidogenic way with formation of Aβ. IL-1 and IL-6 can regulate AβPP synthesis both transcriptionally and translationally, depending on the cell type [6-7]. Certain combinations of cytokines display additive effect on AβPP metabolism: combinations of TNFα and interferon γ (IFNγ) or IL-1β + IFNγ increase essentially Aβ secretion, while used separately they have no effect [8]. Thus, the cytokine link of inflammatory process becomes a new target on the way of amyloidosis suppression.

Polyphenols draw attention among natural substances with anti-inflammatory properties [9]. Curcumin [1,7-bis(hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dion] is one of the most studied representatives of this class compounds. The system bioavailability of curcumin is very low that is explained by its insolubility in water and quick metabolism in the liver, kidneys and gastric wall. Despite that, curcumin is considered one of the most promising candidates of natural origin having anti-inflammatory influence without side effects [10]. It has been established that the mechanism of anti-inflammatory activity of curcumin includes:

• activation inhibition of the transcription factor NFκB which regulates expression of pro-inflammatory gene products [11];

• down-regulation of expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) [12];

• expression inhibition of inflammatory cytokines, including TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, chemokines [13].

The inhibiting effect of curcumin on the nuclear factor κB (NFκB)-signal path occupies a central place in ensuring its anti-inflammatory properties. Curcumin blocks IκB-mediated phosphorylation and degradation of inhibitory protein IκBα, as a result NFκB remains in the complex with IκBα in cytoplasm and cannot enter a nucleus to activate the transcription. Investigations of the suppression of NFκB activity have demonstrated further down-regulation of COX-2 and inducible NO-synthase, as well as a decrease of synthesis of inflammatory markers [14]. In correspondence with its effect on NFκB curcumin inhibits production of inflammatory cytokines, including IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 and others, by mononuclears or macrophages of peripheral circulation [15].

Microglia is a derivative of bone marrow monocytes. It consists of a network of immunoprotective cells which respond to impulse activity of neurons and mediate neuro-immune interaction [16]. That is why the modeling of the effects of β-amyloid peptide 42 and curcumin on monocyte suspension *in vitro* corresponds to the effect of these factors in the brain microglia *in vivo*.

The work aim was to investigate the effect of aggregated $A\beta_{42}$ on the expression dynamics and formation of endogenous $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) by mononuclears of the peripheral blood *in vitro* and correction of such effect by curcumin.

Materials and Methods

The work has been made in accordance with *Universal Declaration on Bioethics and Human Rights* (UN, 1997). Mononuclear cells of human peripheral blood were isolated ex tempera with the help of ficoll-urografin gradient from the samples of venous blood of three healthy volunteers, separately. After triple washing of cell suspension with sterile physiologic solution of room temperature the mononuclears were resuspended in RPMI medium to concentration of 2×10^6 cells/ml. The RNAse inhibitor was added to RPMI to prevent mRNA degradation. Thus the obtained samples of suspensions of mononuclear cells were used to investigate the effect of β-amyloid peptide 42 (in a dose of 15 nM), curcumin (in a dose of 54 nM) separately and their united action (at analogous concentrations). The results were standardized by the corresponding indices of cell suspension which was added only 0.9% NaCl. The ratio of volumes of mononuclear suspension and corresponding impurities (curcumin, $A\beta_{42}$, 0.9% NaCl) was 100:1.

Aβ42_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich), dissolved in bidistilled water, was aggregated during 24 h at 37 °C. Big coarse conglomerates of Aβ42_Human were dispersed with ultrasound and sterilized directly before adding. Since curcumin is low-soluble in water, the concentrated output curcumin solution was first prepared in 96% ethanol, diluted by bidistilled water about 0.7 g/l (directly before adding) to mononuclear suspension.

The dynamics of $A\beta_{42}$ and 0.9% NaCl effect on mononuclears was studied at the 0, 1, 3, 6 and 24^{th} hours of their incubation at 37 °C and stirring rate 600 rpm. The dynamics of curcumin effect and joint action of $A\beta_{42}$ + curcumin was studied at the 3, 6 and 24^{th} hours of incubation, thereat curcumin was

added after 1 h incubation of mononuclear suspension with $A\beta_{42}$ or with 0.9% NaCl. In corresponding terms of incubation the aliquots of suspensions were taken and cells were ruined under three-minute action of ultrasound with frequency 2.64 MHz and intensity 0.25 W/cm^3 in the device MUSSON-1. After that the samples were centrifuged at 6 000 rpm during 20 min, and supernatant was used for further measurements.

Relative expression at mRNA level for *AβPP*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6* and *IL-10* genes was determined in mononuclears by the method of polymerase chain reaction (PCR) with the help of corresponding primers in all terms of incubation. RNA was isolated from cells using a set "RIBO-sorb" "AmpliSens" (RF). Gene expression analysis was performed by PCR method in real time. Complementary DNA (cDNA), obtained in the course of the reverse transcription reaction using a set "AmpliSens" (RF), were used as a matrix. Rotor-Gene Q (QIAGEN) (Germany) and specific primers produced by Sintol (RF) were used for amplification:

AβPP (NM_000484):
forward 3′-AACCAGTGACCATCCAGAAC-5′,
reverse 3′-ACTTGTCAGGAACG AGAAGG-5′,

IL-1β (NM_000576.2):
forward 3′-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-5′,
reverse 3′-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-5′,

TNFα (NM_000594.2):
forward 3′-CCCAGGGACCTCTCTCTAATC-5′,
reverse 3′-ATGGGCTACAGGCTTGTCACT-5′,

IL-6 (NM_000600):
forward 3′-GGTCTTTGCTGCTTTCACAC-5′,
reverse 3′-GGTACATCCTCGACGGCATC-5′,

IL-10 (NM_007527.3):
forward 3′-CATCGATTTCTTCCCTGTGAA-5′,
revese 3′-TCTTGGAGCTTATTAAAGGCATTC-5′,

ACTB (NM_001101.3):
forward 3′-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-5′,
reverse 3′-CGATCCACACGGAGTACTTG-5′.

The amplification reactions were conducted as triplets for each gene in the following conditions: 60 s at 95 °C, 40 cycles: 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C using SYBR Green mix (Amplisence, RF). To the reaction mixtures were added the following concentrations of $MgCl_2$ (AmpliSence, RF): 1 mM for amplification of gene *AβPP*, 2 mM for amplification of genes *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* and *ACTB*, 4 mM for amplification of gene *TNFα*. The expression level was determined by Ct delta method. The data obtained were standardized by the expression of referent gene *ACTB* (for β-actin) in the form of the relation of the number of cDNA copies of the determined factor to the number of cDNA copies of *ACTB* [17] and were expressed in conventional expression units (c.e.u.).

ELISA determined the concentration of cytokines in supernatants of mononuclear suspension in correspondence to the protocol of Vector-Brest, RF for IL-1β, IL-6, IL-10 and TNFα, and also $A\beta_{40}$ by the set ELISA Kit Human Aβ40, Invitrogen Corporation. Optical density was read by microplate analyzer GBG Stat FAX 2100 (USA) at 450 nm with wavelength correction at 630 nm. ELISA data were computed for total protein (ng/g of protein). Results were presented on Figures in percentage of the indices of mononuclear suspensions, which had been incubated with 0.9% NaCl. Total protein concentration was determined by the Lowry method [18].

The results were processed statistically, mean values and standard deviations for mononuclear suspension indices were calculated. Statistical analysis of differences was carried out using Student's *t*-test. The value $P < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

Table 1 data illustrate the absence of dynamics of the basal level of mRNA expression of *AβPP* and cytokines (*IL-1β*, *TNFα*, *IL-6*, *IL-10*) in mononuclears under the effect of 0.9% NaCl, except for inconsiderable, in view of the research objective, variation of $mRNA^{TNF\alpha}$, since the latter is connected with nonspecific circadian fluctuations of gene *TNFα* expression in mononuclear suspension *in vitro* [19, 20].

In contrast to basal expression level of mRNA under study, concentrations of $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in the mononuclear suspension under the effect of 0.9% NaCl changed in different directions during 24 h (Table 2).

The increase of content of endogenous $A\beta_{40}$ for the 6th hour of incubation with the absence of AβPP expression activation may be explained by intensification of amyloidogenic processing of already existing molecules of the precursor protein of β-amyloid peptide. As to dynamics of the basal level of cytokines (spontaneous production) in mononuclear suspension (Table 2), a probable decrease of IL-1β concentrations (for the 1 and 24th h), IL-6 (1-3th h) and IL-10 (1st h) explains the degradation of those peptides with a short half-life (<0.5 h) [21],

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 1

Table 1. Basal level of mRNA expression of AβPP and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in mononuclears under the effect of 0.9% NaCl during 24 h

mRNA for	Incubation time (h)				
	0	1	3	6	24
AβPP	0.30 ± 0.06	0.44 ± 0.17	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.07	0.30 ± 0.15
IL-1β	2.41 ± 0.22	2.35 ± 0.23	2.75 ± 0.34	2.76 ± 0.26	2.76 ± 0.27
TNFα	3.39 ± 0.61	2.74 ± 0.78	3.02 ± 0.13	2.37 ± 0.18*	3.14 ± 0.31
IL-6	2.10 ± 0.48	1.98 ± 0.17	2.66 ± 0.48	1.19 ± 0.47	1.41 ± 0.49
IL-10	4.39 ± 0.29	4.18 ± 0.43	3.66 ± 0.48	4.11 ± 0.31	5.03 ± 0.58

* $P < 0.05$ compared to preincubation (0 h). Conventional expression unit

Table 2. Basal level of concentration of $A\beta_{40}$ and cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) in mononuclear suspension under the effect of 0.9% NaCl during 24 h

Index	Incubation time (h)				
	0	1	3	6	24
$A\beta_{40}$	67 ± 6	75 ± 8	78 ± 9	128 ± 10*	57 ± 6
IL-1β	859 ± 87	610 ± 60*	745 ± 75	903 ± 90	608 ± 62*
TNFα	42 ± 4	96 ± 10*	178 ± 19*	286 ± 29*	133 ± 15*
IL-6	755 ± 80	302 ± 29*	493 ± 57*	662 ± 72	875 ± 88
IL-10	63 ± 7	36 ± 4*	53 ± 6	57 ± 6	56 ± 5

* $P < 0.05$ compared to preincubation (0 h). Nanograms per 1 g of protein.

while the increase of TNFα content on the background of the corresponding inhibition of expression (Table 1) probably owes to enzymatic activity of TNFα-converting enzyme (ADAM17) [22].

β-Amyloid peptide 42 in aggregated form did no effect on the expression of $mRNA^{TNF\alpha}$ in the suspension of mononuclears *in vitro* and caused an increase of concentration of the tumor necrosis factor α itself for the 3rd hour of incubation (Fig. 1).

Curcumin solution added to the suspension of mononuclear cells of human peripheral blood after 1 hour of toxic effect of $A\beta_{42}$ inhibited the expression of $mRNA^{TNF\alpha}$ (for the 3rd hour of incubation) and decreased considerably TNFα concentration. However, the inhibiting effect of curcumin proved short-term and, already for the 6-24th hour of incubation the expression level of $mRNA^{TNF\alpha}$ was renewed (Fig. 1, *A*), while TNFα content was doubled (Fig. 1, *B*). The modulating effect of curcumin itself on the dynamics of $mRNA^{TNF\alpha}$ and TNFα content in the mononuclear suspension coincided with this polyphenol effect on the background of toxic effect of $A\beta_{42}$ (Fig. 1).

In our research the changes of $mRNA^{IL\text{-}1\beta}$ expression by mononuclears were not clarified for any factor under study (Fig. 2, *A*), but the content of this pro-inflammatory interleukin varied essentially with adding curcumin (Fig. 2, *B*). Such non-apparent result may be explained only by curcumin ability to accelerate creation of the active form of IL-1β from its precursor under the catalytic action of caspase-1 [23].

The induction in the interval of $A\beta_{42}$ effect of 3-6 h and simultaneous essential expression inhibition with curcumin were established for gene IL-6 (Fig. 3, *A*). The inhibiting effect of curcumin at the transcription level in mononuclear suspension was preserved for the day of incubation as well. At the translation level the increase of $mRNA^{IL\text{-}6}$ under the effect of $A\beta_{42}$ resulted in the corresponding enrichment of the mononuclear suspension with IL-6 for the 3th h and further decrease of this interleukin concentration at time interval of 6-24 h (Fig. 3, *B*). The content of IL-6 proved to be lower in 6-24 h of curcumin effect itself compared to $A\beta_{42}$ effect in that period. Thus the effect of curcumin on the course of inflammatory process in mononuclears proved to be direct and dominating, though short-term, compared to $A\beta_{42}$ effect.

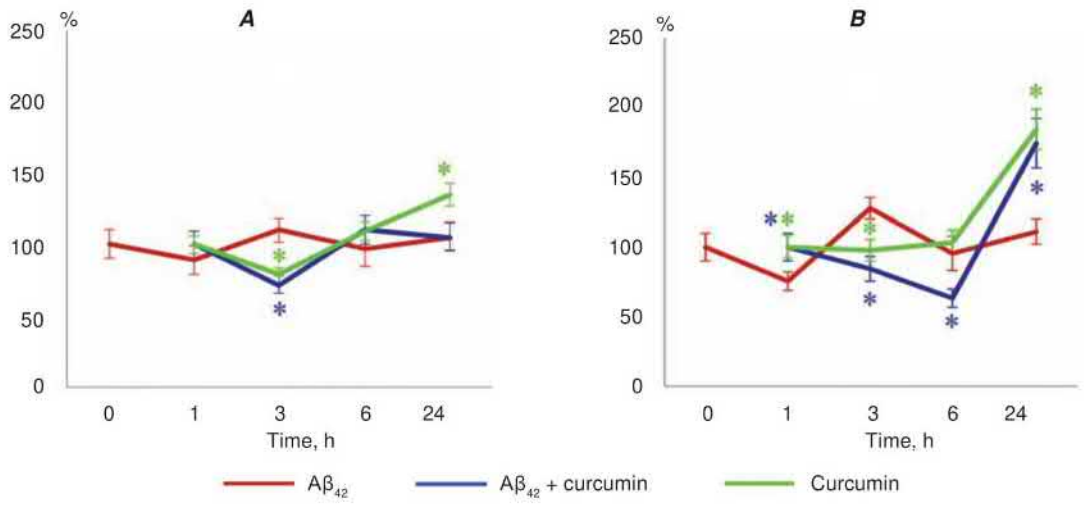


*Fig. 1. Dynamics of mRNA$^{TNF\alpha}$ expression (A) and TNFα content (B) in the suspension of mononuclears under the effect of $A\beta_{42}$, curcumin and their joint action (in % of the basal level with 0.9% NaCl, taken as 100%). Here and in Fig. 2-5 * P < 0.05 compared with $A\beta_{42}$ effect*

The results obtained conform to recently published data on dose-dependent inhibiting effect of curcumin on the content of IL-1β, TNFα, IL-6 and their mRNA in $A\beta_{42}$-activated microglia [24]. The work authors associate curcumin effect with phosphorylation of ERK1/2 and p38 and thus blocking of just these intracellular signal paths. Our data also partially coincide with results of the work by Jian Jiao with co-authors [25], where they show the increase of TNFα and IL-1β concentrations in microglia culture when adding monomers, oligomers or fibrils of $A\beta_{42}$ in concentration range of 0.625-2.5 μM with maximum for the 12th h of incubation. The authors suppose the NFκB-dependent induction of pro-inflammatory cytokines by various forms of $A\beta_{42}$.

The effect of $A\beta_{42}$ on the expression of anti-inflammatory IL-10 was not established (Fig. 4, *A*), but curcumin raised mRNA$^{IL\text{-}10}$ content for the 6th h,

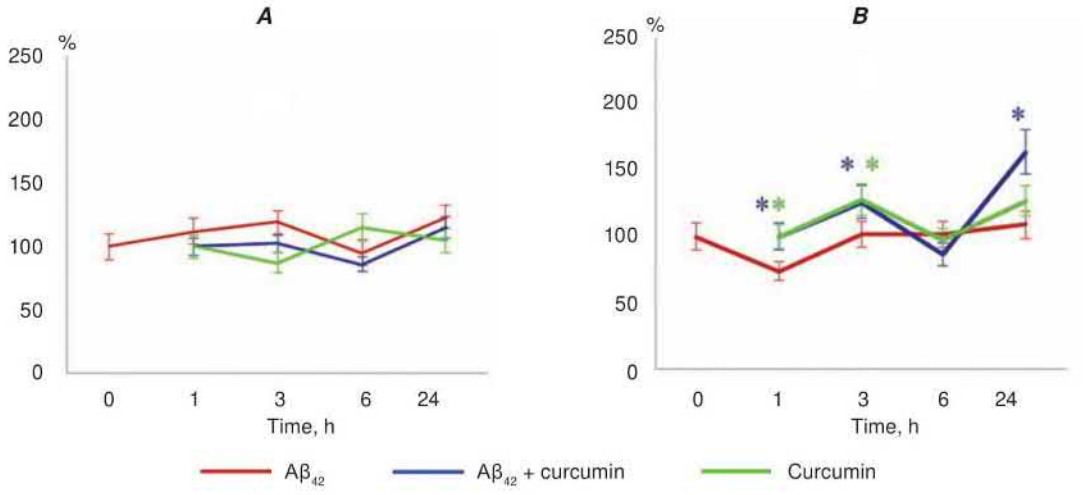


Fig. 2. Dynamics of mRNA$^{IL\text{-}1\beta}$ expression (A) and IL-1β content (B) in mononuclear suspension under the effect of $A\beta_{42}$, curcumin and their joint action (in % of the basal level with 0.9% NaCl, taken as 100%)

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 1

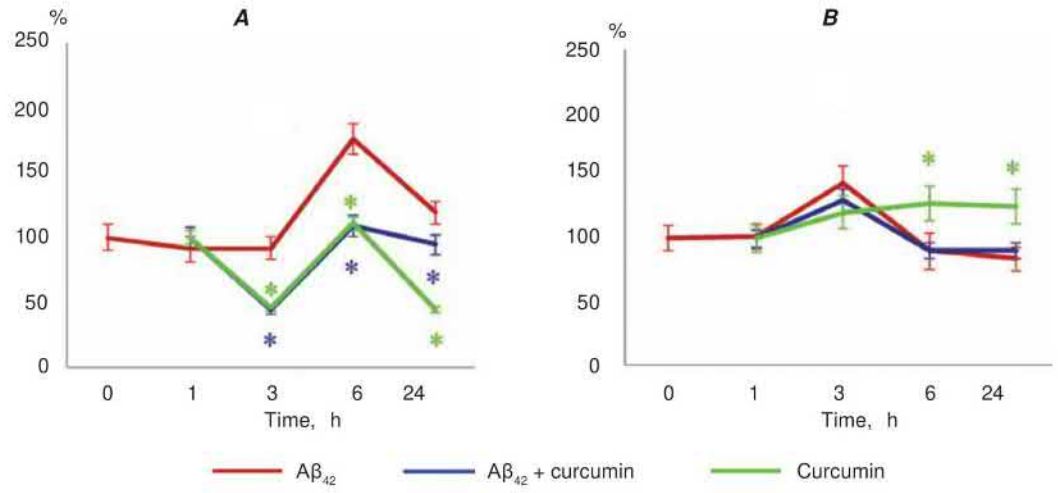


Fig. 3. Dynamics of mRNA$^{IL\text{-}6}$ expression (A) and IL-6 content (B) in mononuclear suspension under the effect of $A\beta_{42}$, curcumin and their joint action (in % of the basal level with 0.9% NaCl, taken as 100%)

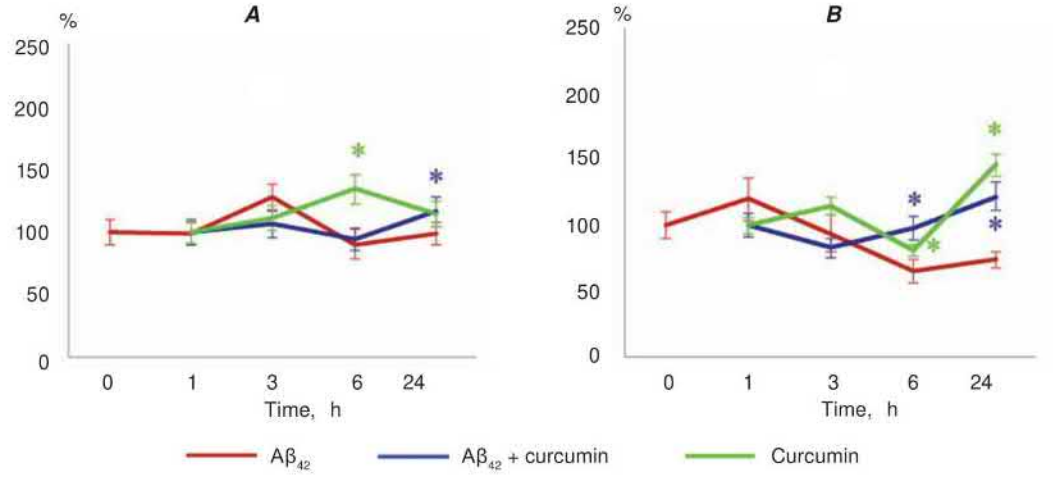


Fig. 4. Dynamics of mRNA$^{IL\text{-}10}$ expression (A) and IL-10 content (B) in mononuclear suspension under the effect of $A\beta_{42}$, curcumin and their joint action (in % of the basal level with 0.9% NaCl, taken as 100%)

while simultaneously with $A\beta_{42}$ – only for the 24th h of incubation. Beginning from the 1st h of incubation with $A\beta_{42}$ the authors observed a sharp drop of IL-10 level in mononuclear suspension, which could be stopped by curcumin from the 6th h only (Fig. 4, *B*). Some authors supposed that high level of IL-10 might be a good prediction sign in the dynamics of inflammatory process in general and under amyloidosis in particular [26, 27]. But there appeared researches which results evidence for the effect of IL-10 on the level of apolipoprotein E and clearance of β-amyloid peptide that led to formation of amyloid platelets [28].

We have studied the dynamics of concentration of endogenous $A\beta_{40}$ in mononuclear suspension under the effect of exogenous $A\beta_{42}$ (Fig. 5, *B*). We can see two maxima of this peptide formation: for the 1st and 24th h of incubation. In view of the absence of *AβPP* expression activation for the 1st h (Fig. 5, *A*) such a quick and intensive response to the action of

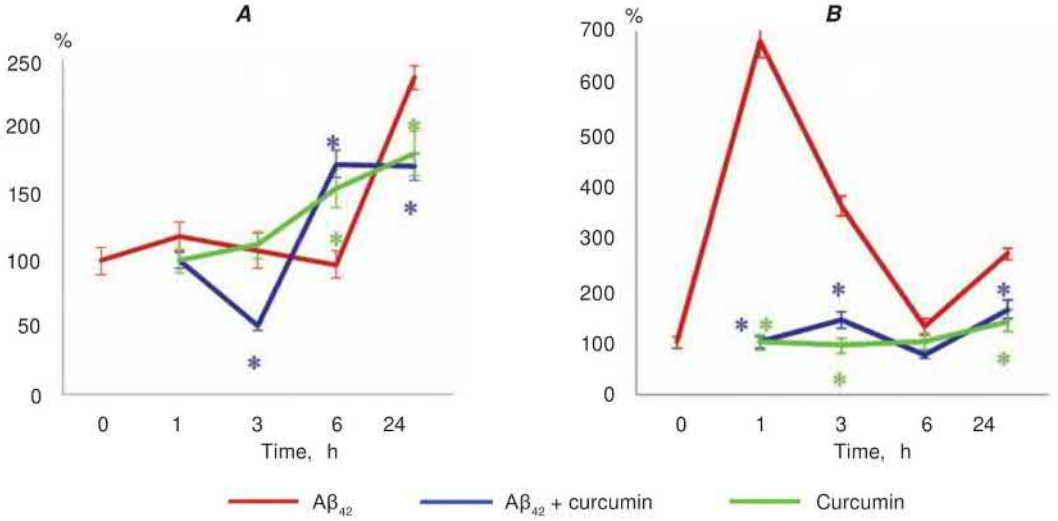


Fig. 5. Dynamics of mRNA^{AβPP} expression (A) and $Aβ_{40}$ content (B) in mononuclear suspension under the effect of $Aβ_{42}$, curcumin and their joint action (in % of the basal level with 0.9% NaCl, taken as 100%)

$Aβ_{42}$, compared with the cytokine system, owes to activation of processing of β-amyloid peptide precursor following the amyloidogenous scenery with formation of endogenous $Aβ_{40}$. The second peak of $Aβ_{40}$ concentration (for the 24th h) is the result of induction of AβPP expression and increase of its mRNA^{AβPP} in this time interval (Fig. 5, *A, B*).

The inhibiting effect of curcumin has been shown both on the expression and synthesis of AβPP and formation of $Aβ_{40}$. The mRNA^{AβPP} expression minimum was noted for the 3rd h of incubation, and the level of $Aβ_{40}$ in the presence of curcumin did not essentially differ from the initial one (Fig. 5, *A*). The data obtained may evidence for curcumin efficiency in normalization of β-amyloid peptide metabolism even in pro-inflammatory condition, determined by the local excess of $Aβ_{42}$ aggregates. Curcumin properties in inhibiting the formation and destabilization of Aβ-oligomers as well as in ruining a senile platelet are well known now [29-30].

Thus the dynamics of anti-inflammatory effect of curcumin *in vitro* at transcriptional and translational levels of cytokines formation by mononuclears has been cleared, as well as its direct inhibiting effect on the level of endogenous $Aβ_{40}$ during the 24-h incubation under the toxic effect of $Aβ_{42}$ aggregates has been established in this work.

ВПЛИВ β-АМІЛОЇДНОГО ПЕПТИДУ 42 НА ДИНАМІКУ ЕКСПРЕСІЇ І УТВОРЕННЯ $Aβ_{40}$, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ *IN VITRO* ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ КУРКУМІНОМ

В. В. Соколік[1], О. К. Коляда[2], С. М. Шульга[3]

[1]ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України», Харків;
[2]ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ;
[3]ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ;
e-mail: sokolik67@rambler.ru

Токсичний ефект Аβ-олігомерів супроводжує перебіг хронічного запального процесу, основними медіаторами якого є цитокіни. Тому цитокінова ланка запального процесу постає новою мішенню на шляху приборкання амілоїдозу. Метою дослідження був ефект агрегованого $Aβ_{42}$ на динаміку експресії і утворення ендогенного $Aβ_{40}$ і цитокінів (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) мононуклеарами периферійної крові *in vitro* та його корекція куркуміном. Суспензію мононуклеарних клітин, ізольованих *ex tempore* за допомогою фікол-урографінового градієнта зі

ISSN 2409-4943. Ukr. Biochem. J., 2016, Vol. 88, N 1

зразків венозної крові здорових добровольців, використовували для дослідження впливу $A\beta_{42}$ (15 нМ), куркуміну (54 пМ) та їх поєднаної дії (за аналогічних концентрацій) в динаміці часу: 0, 1, 3, 6 і 24 год інкубації при температурі 37 °С. Методом полімеразної ланцюгової реакції визначали експресію генів *АβРР*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6* і *IL-10* та імуноензимним аналізом встановлювали вміст $A\beta_{40}$ і цитокінів у мононуклеарній суспензії в динаміці інкубації. Показали індивідуальну динаміку експресії АβРР і цитокінів за дії $A\beta_{42}$, який впливав на вміст $A\beta_{40}$, TNFα, IL-1β, IL-6 і IL-10 у мононуклеарній суспензії. Куркумін виявив інгібування експресії генів *АβРР*, *TNFα* і *IL-6*, що позначилося на зниженні рівня цих двох цитокінів і $A\beta_{40}$. У роботі показано динаміку антизапального впливу куркуміну *in vitro* на транскрипційному і трансляційному рівнях утворення цитокінів мононуклеарами. Встановлено безпосередній пригнічувальний ефект куркуміну на концентрацію ендогенного $A\beta_{40}$ протягом добової інкубації за умов токсичної дії агрегатів $A\beta_{42}$.

Ключові слова: куркумін, β-амілоїдні пептиди 40 і 42, цитокіни, мРНК, мононуклеари периферійної крові людини.

ВЛИЯНИЕ β-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА 42 НА ДИНАМИКУ ЭКСПРЕССИИ И ОБРАЗОВАНИЯ $A\beta_{40}$, IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ *IN VITRO* И ЕГО КОРРЕКЦИЯ КУРКУМИНОМ

В. В. Соколик[1], А. К. Коляда[2], С. М. Шульга[3]

[1]ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков;
[2]ГУ «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарёва НАМН Украины», Киев;
[3]ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев;
e-maiL: sokolik67@rambler.ru

Токсический эффект Аβ-олигомеров сопровождает течение хронического воспалительного процесса, основными медиаторами которого являются цитокины. Поэтому цитокиновое звено воспалительного процесса становится новой мишенью на пути обуздания амилоидоза. Целью исследования был эффект агрегированного $A\beta_{42}$ на динамику экспрессии и образования эндогенного $A\beta_{40}$ и цитокинов (IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10) мононуклеарами периферической крови *in vitro* и его коррекция куркумином. Суспензию мононуклеарных клеток, изолированных *ex tempore* с помощью фикол-урографинового градиента из образцов венозной крови здоровых добровольцев, использовали для изучения влияния $A\beta_{42}$ (15 нМ), куркумина (54 пМ) и их сочетанного действия (при аналогичных концентрациях) в динамике времени: 0, 1, 3, 6 и 24 ч инкубации при температуре 37 °С. Методом полимеразной цепной реакции с помощью соответствующих праймеров определяли относительную экспрессию мРНК для *АβРР*, *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* и иммуноэнзимным анализом устанавливали содержание $A\beta_{40}$. Показали индивидуальную динамику экспрессии АβРР и изучаемых цитокинов под действием $A\beta_{42}$, которая влияла на содержание $A\beta_{40}$, TNFα, IL-1β, IL-6 и IL-10 в мононуклеарной суспензии. Куркумин выявил ингибирующий эффект на экспрессию генов *АβРР*, *TNFα* и *IL6*, что сказалось на снижении уровня этих двух цитокинов и $A\beta_{40}$. В работе показана динамика антивоспалительного влияния куркумина *in vitro* на транскрипционном и трансляционном уровнях образования цитокинов мононуклеарами. Установлен непосредственный угнетающий эффект куркумина на концентрацию эндогенного $A\beta_{40}$ в течение суточной инкубации в условиях токсического действия агрегатов $A\beta_{42}$.

Ключевые слова: куркумин, β-амилоидные пептиды 40 и 42, цитокины, мРНК, мононуклеары периферической крови человека.

References

1. Koudinova N. V., Berezov T. T., Koudinov A. R. Beta-amyloid: Alzheimer's disease and brain beta-amyloidoses. *Biochemistry* (Mosc). 1999; 64(7): 752-757.
2. Hardy J., Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002; 297(5580): 353-356.
3. Jarrett J. T., Berger E. P., Lansbury P. T. Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993; 32(18): 4693-4697.
4. Walsh D. M., Klyubin I., Fadeeva J. V., Cullen W. K., Anwyl R., Wolfe M. S.,

Rowan M. J., Selkoe D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. 2002; 416(6880): 535-539.

5. Rasin S. M., Podkoritov V. S., Rasin M. The role of chronic system inflammation and insulin resistance in the pathway of senile dementia. *Psychiatry*. 2011; 2(50): 46-54. (In Russian).
6. Forloni G., Demicheli F., Giorgi S., Bendotti C., Angeretti N. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1992; 16(1-2): 128-134.
7. Yang Y., Quitschke W. W., Brewer G. J. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester, IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998; 60(1): 40-49.
8. Blasko I., Veerhuis R., Stampfer-Kountchev M., Saurwein-Teissl M., Eikelenboom P., Grubeck-Loebenstein B. Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 2000; 7(6 Pt B): 682-689.
9. Nawaz A., Khan G. M., Hussain A., Ahmad A., Khan A., Safdar M. Curcumin: a natural product of biological importance. *Gomal. Univ. J. Res.* 2011; 27(1): 7-14.
10. Basnet P., Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*. 2011; 16(6): 4567-4598.
11. Perrone D., Ardito F., Giannatempo G., Dioguardi M., Troiano G., Lo Russo L., De Lillo A., Laino L., Lo Muzio L. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp. Ther. Med.* 2015; 10(5): 1615-1623.
12. Plummer S. M., Holloway K. A., Manson M. M., Munks R. J., Kaptein A., Farrow S., Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*. 1999; 18(44): 6013-6020.
13. Jobin C., Bradham C. A., Russo M. P., Juma B., Narula A. S., Brenner D. A., Sartor R. B. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 1999; 163(6): 3474-3483.
14. Han S. S., Keum Y. S., Seo H. J., Surh Y. J. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002; 35(3): 337-342.
15. Lee W. H., Loo C. Y., Bebawy M., Luk F., Mason R. S., Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 2013; 11(4): 338-378.
16. Villoslada P., Moreno B., Melero I., Pablos J. L., Martino G., Uccelli A., Montalban X., Avila J., Rivest S,. Acarin L., Appel S., Khoury S. J., McGeer P., Ferrer I., Delgado M., Obeso J., Schwartz M. Immunotherapy for neurological diseases. *Clin Immunol*. 2008; 128(3): 294-305.
17. Vignini A., Morganti S., Salvolini E., Sartini D., Luzzi S., Fiorini R., Provinciali L., Di Primio R., Mazzanti L., Emanuelli M. Amyloid precursor protein expression is enhanced in human platelets from subjects with Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: a real-time PCR study. *Exp. Gerontol.* 2013; 48(12): 1505-1508.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1): 265-275.
19. Hashiramoto A., Yamane T., Tsumiyama K., Yoshida K., Komai K., Yamada H., Yamazaki F., Doi M., Okamura H., Shiozawa S. Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha. *J. Immunol.* 2010; 184(3): 1560-1565.
20. Keller M., Mazuch J., Abraham U., Eom G. D., Herzog E. D., Volk H. D., Kramer A., Maier B. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(50): 21407-21412.
21. Surgery: Basic Science and Clinical Evidence. Ed. Norton J. A., Bollinger R. R., Chang A. E., Lowry S. F. New York: Springer-Verlag, 2001. 2095 p.
22. Schwarz J., Broder C., Helmstetter A., Schmidt S., Yan I., Müller M., Schmidt-Arras D., Becker-Pauly C., Koch-Nolte F., Mittrücker H. W., Rabe B., Rose-John S., Chalaris A. Short-term TNFα shedding is independent of cytoplasmic

phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1833(12): 3355-3367.

23. Schönbeck U., Mach F., Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.* 1998; 161(7): 3340-3346.
24. Shi X., Zheng Z., Li J., Xiao Z., Qi W., Zhang A., Wu Q., Fang Y. Curcumin inhibits Aβ-induced microglial inflammatory responses *in vitro:* Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neurosci. Lett.* 2015; 594: 105-110.
25. Jiao J., Xue B., Zhang L., Gong Y., Li K., Wang H., Jing L., Xie J., Wang X. Triptolide inhibits amyloid-beta1-42-induced TNF-alpha and IL-1beta production in cultured rat microglia. *J. Neuroimmunol.* 2008; 205(1-2): 32-36.
26. Apelt J., Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res.* 2001; 894(1): 21-30.
27. Asselineau D., Benlhassan K., Arosio B., Mari D., Ferri E., Casati M., Gussago C., Tedone E., Annoni G., Mazzola P., Piette F., Belmin J., Pariel S., Bornand A., Beaudeux J. L., Doulazmi M, Mariani J., Bray D. H. Interleukin-10 Production in Response to Amyloid-β Differs between Slow and Fast Decliners in Patients with Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2015; 46(4): 837-842.
28. Michaud J. P., Rivest S. Anti-inflammatory signaling in microglia exacerbates Alzheimer's disease-related pathology. *Neuron.* 2015; 85(3): 450-452.
29. Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro. J. Neurosci. Res.* 2004; 75(6): 742-750.
30. Garcia-Alloza M., Borrelli L.A., Rozkalne A., Hyman B. T., Bacskai B. J. Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J. Neurochem.* 2007; 102(4): 1095-1104.

Received 29.01.2016

BIOTECHNOLOGIA ACTA, V. 8, No 6, 2015

UDC 612.015:616.153.96:616.894 doi: 10.15407/biotech8.06.048

EFFECT OF CURCUMIN LIPOSOMAL FORM ON ANGIOTENSIN CONVERTING ACTIVITY, CYTOKINES AND COGNITIVE CHARACTERISTICS OF THE RATS WITH ALZHEIMER'S DISEASE MODEL

V. V. Sokolik[1]
S. M. Shulga[2]

[1]State Enterprise "Institute for Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv
[2]State Enterprise "Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine", Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Recieved 12.10.2015

The purpose of the study was the investigation of curcumin liposome form effect on angiotensin-converting enzyme activity, cytokines and mnestic features of rats with experimental model of Alzheimer's disease. In the animals with intrahippocampal injection of Aβ42_Human, nasal therapy with curcumin liposome form was used. Cytokine concentration and angiotensin converting enzyme activity in brain regions (cerebral cortex and hippocampus) and in blood serum as well as indicators of conditioned avoidance response were registered. It was found that as a result of curcumin therapy the rats with Alzheimer's disease had suppressed cytokine and angiotensin converting enzyme activities and recovered mnestic indices. Nasal therapy with curcumin liposome form gave reduction of angiotensin-converting enzyme activity and anti-cytokine effect in the target regions of the brain (cerebral cortex and hippocampus), which helped the rats mnestic features and memory recovery.

Key words: curcumin, liposomes, β-amyloid peptide, cytokines, angiotensin converting enzyme.

The hitherto used approaches to treatment of dementia and amyloidosis in the case of Alzheimer's disease (AD) concentrated on suppression of β-amyloid peptide (Aβ) production and aggregation or on symptomatic therapy are ineffective [1–5], therefore correction of chronic inflammation provoked by amyloidosis will have positive effect. The mechanism by which Aβ causes the damage and death of neurons is generation of oxygen active forms in the course of own aggregation. At the same time neuron membranes lipids peroxidation is activated and ATPases function is deteriorated. As a result Aβ conduces to depolarization of synaptic membranes, excessive ingress of Ca^{2+} and mitochondrial insufficiency [6–8]. All these processes are concurrent with non-specific inflammatory reaction which is transformed into chronic form and induces synthesis of Aβ protein precursor (AβPP) and its processing pursuant to amyloidogenic scenario [9–11]. It is shown that the inflammatory process in case of AD is characterized by increased peripheral concentrations of anti-inflammatory cytokines and higher TGF-β levels in spinal cord liquid [12]. On the other side, cytokines, similar to Aβ, are mediators of inborn immunity [13, 14]. Their effect comes up through receptor activation of intracellular signals, which results in translocation of nuclear factor (NFκB) towards nucleus and activation of protein synthesis *de novo* [12]. In the end, the existing anti-cytokine therapy poorly represented itself for amyloidosis, except for anti-inflammatory effect of IL-10 [15]; although AD risk is lower in patients who take non-steroid anti-inflammatory preparations [16, 17]. Therefore we assumed that curcumin (CUA) with its anti-inflammatory properties may have essential therapeutic effect against Aβ-induced neurotoxicity and cognitive deficiency.

It is found that natural polyphenol CUA regulates NFκB, AP-1 transcription factors; suppresses expression of cyclooxygenase-2,

lipoxygenase, NO-synthase, matrix metalloproteinase-9, urokinase of plasminogen activator type, TNF, chemokines, cellular adhesion molecules and D1 cycline, inhibits expression of growth factor receptors and activity of JNK, protein tyrosine kinases as well as some other protein serine/threonine kinases [18, 19]. Curcumin also acts as inhibitor of DNA-methyltransferase therefore it is regarded as DNA hypomethylating agent. It establishes equilibrium between histone acetyltransferase and histone acetylase enzymes activity thus modulates expression of certain genes. At last CUA modulates activity of microRNA and their numerous target genes [20, 21]. Above-mentioned CUA effects are exhibited in its antioxidant, anti-inflammatory, anti-tumor and even anti-amyloidogenic properties [22–27]. The problem with curcumin usage, like with the other hydrophilic anions, lies only in the fact that it cannot enter the cell through plasmatic membrane on its own. Therefore it is reasonable to use nanocarriers, in particular, liposomes, as CUA carriers. Liposome advantages are obvious: prepared from natural phospholipids, they compared to other polymeric delivery systems, completely biodegrade in the body and are biocompatible [28].

β-Amyloid peptide aggregation process results in imbalance between its production and degradation. One of the systems, which maintain low Aβ level in tissues, are zinc metalloproteinases [29]. Angiotensin-converting enzyme (ACE) [EC 3.4.15.1], which is involved in regulation of arterial blood pressure, neuropeptide exchange, immune responses of the body is also among them [30]. This enzyme (chiefly its C-domain) separates C-terminal dipeptides from oligopeptides of various structures which have a free carboxyl group. But ACE interacts with Aβ exclusively by N-domain and decomposes Arg5–His6 or Asp7–Ser8 peptide bonds [30]. ACE is an integral membrane glycoprotein of the1st type which is released to blood circulation by zinc metalloesterase at the rate of 2% per hour therefore this enzyme functions both in bonded and dissolved forms. According to the conclusions of *ACE1* gene polymorphism and enzyme inhibitors studies it was found that ACE activity reduction is associated with AD risk and Aβ accumulation [31].

The purpose of the study was investigation of curcumin liposome form effect on ACE activity, cytokines and mnestic features of rats with experimental model of Alzheimer's disease.

Materials and Methods

The study involved 30 male rats of sexually mature age, with 200 to 250 g weight. All the animals were kept under controlled 12-hour light-darkness cycle with standard fodder for rodents and tap water. Experimental protocols were conducted in accordance with the rules of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The rats were randomly distributed into 5 groups (6 animals in each). The reference group included intact animals; group 1 — the rats 1 month after intrahippocampal injection of Aβ42_Human (experimental model of AD); group 2 — sham operated animals; group 3 — the rats with AD experimental model which received daily nasal therapy with curcumin liposome form for 1 month, and group 4 — animals with AD experimental model which received daily nasal therapy with empty liposomes also for 1 month.

Beforehand, during 20 days conditioned avoidance response was formed in the rats on the basis of unconditioned reflex [32]. Infallible conditioned responses to metronome sound were considered as positive result. Apart from positive response portion (in %), the study registered duration of latent period of conditioned avoidance response in seconds. Animals from all groups were tested in the conditioned avoidance response parameters after AD experimental model formation in them and nasal therapy with curcumin liposome form or empty liposomes.

Aβ42_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich), dissolved in bidistilled water was aggregated for 24 hours at 37 °C. Aβ42_Human large size rough conglomerates were dispersed by ultrasound and sterilized immediately before injection. The effect of 42_Human β-amyloid peptide was studied 1 month after its single injection in the dose of 15 nM Aβ42_Human to the hippocampus of the rats' brain. Solution volume was 10 mcl per animal. Stereotaxic coordinates of the left hippocampus were determined using the brain map of the rats [33], which corresponds to the distance from the intersection point of sagittal seam and bregma (zero point): distally — 2 mm, laterally — 2 mm and in depth — 3.5 mm. The stereotaxic operations in experimental animals were made under general anesthesia using intra-abdominal injections of thiopental (50 mg/kg of body weight).

To prepare liposomes with curcumin, lecithin/cholesterol was dissolved in the round-bottom flask at ratio 18:1 in 50% ethanol. After the lipid film was formed as a result of the solvent evaporation, 28.85 mM CUA in 5 ml of PBS buffer (10 mM Na_2HPO_4, 1.76 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) was added and thoroughly mixed for suspension of liposomes with curcumin formation. The suspension of empty liposomes was prepared using the similar protocol but at the final stage PBS buffer without CUA was added. Both liposome suspensions were dissolved with PBS buffer to 0.7 g/l CUA immediately before nasal administration to the rats in the dose of 3.5 μg/animal. Daily nasal therapy of the rats with AD experimental model lasted for 1 month. Administration of liposome form curcumin by nasal method is determined by the fact that, unlike peripheral blood circulation, this is the shortest way to the target regions of the rat neocortex. It is known that after entering the body the dissolved curcumin is nearly unable to overcome the hematoencephalic barrier whereas its liposome form is actively and non-specifically entrapped by the formed elements of blood, which requires big doses of the preparation.

After the processing was finished the animals were decapitated. The assays of cerebral cortex and hippocampus were frozen and stored for further measurements. Blood was collected and centrifuged at 1000 g for 20 min. Serum was collected, frozen and stored. The tissues of hippocampus and fronto-coronal cortex were homogenized in Tris-buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged at 14000 g for 5 min producing supernatant.

In the supernatant assays of hippocampus, cerebral cortex and blood serum cytokines were identified using ELISA method in accordance with the protocol Rat ELISA Kit Invitrogen BCM DIAGNOSTICS, USA for interleukine-6 (IL-6), interleukine-10 (IL-10) and tumor necrosis factor α (TNFα). Assay absorption was read out using GBG Stat FAX 2100 (USA) microplate analyzer at 450 nm with wavelength correction at 630 nm. The ELISA data were recalculated into general protein for nerve tissue or expressed in ng/l for blood serum. Concentration of general protein was quantitated by Lowry method [34].

ACE activity was determined by kinetic method [35]. As a substrate the short FAPGG peptide was used, from which by ACE action GG dipeptide was separated and transformed into hippuric acid. Reduction in assay absorption during 10 minute incubation at 37 °C was measured at 340 nm wavelength. Calculation was made using formula:

$$E_{ACE} = (\Delta A_{assay} / \Delta A_{hippuric\ acid\ calibrator}) \cdot E_{calibrator},$$

where ΔA — reduction of absorption during 10 min of incubation at 37 °C; $E_{calibrator} = 82.1$ (protocol B HLMANN ACE colometric kit, Switzerland). ACE activity was expressed in U/l, which corresponds to ACE enzyme quantity, which separates 1 μM hippuric acid at 37 °C per minute per liter for blood serum and per mg of protein for areas of the brain (fronto-coronal cortex and hippocampus).

The obtained results were statistically processed, average values and standard deviations were calculated. Statistical analysis of differences was made using *t*-test. Values at $P < 0.05$ were considered significant.

Results and Discussion

Fig. 1 presents data about increase in ACE activity in hippocampus (direct spot of Aβ42_Human injection) and blood serum and absence of reliable changes in this parameter in cerebral cortex of the rats with AD experimental model. It is first of all due to ACE synthesis induction by one of the substrates local excess, namely Aβ [36]. Nasal therapy with CUA liposome form significantly reduced ACE activity compared to the effect of empty liposomes (Fig. 1) in both investigated brain sections of the rats and in blood serum.

On physiological level, the intrahippocampal injection of Aβ42_Human brought suppression of conditioned avoidance response in the rats of group 1 (Fig. 2). Study of mnestic features and memory showed reduction in the share of positive responses and increase of latent period in these animals compared to the reference group. The share of positive responses in the rats with AD experimental model was not different from that of in the sham operated animals, which is a consequence of intracranial intervention. Curcumin in liposomes was responsible for recovery of mnestic features and memory parameters in the rats with AD experimental model, which was not the case when empty liposomes were used (Fig. 2).

The most substantial cytokine activation was registered in hippocampus of the animals with AD experimental model (Table 1): Concentration of TNFα increased by 26%, IL-6 — by 27% and IL-10 — by 95%, respectively. These data show that Aβ42_

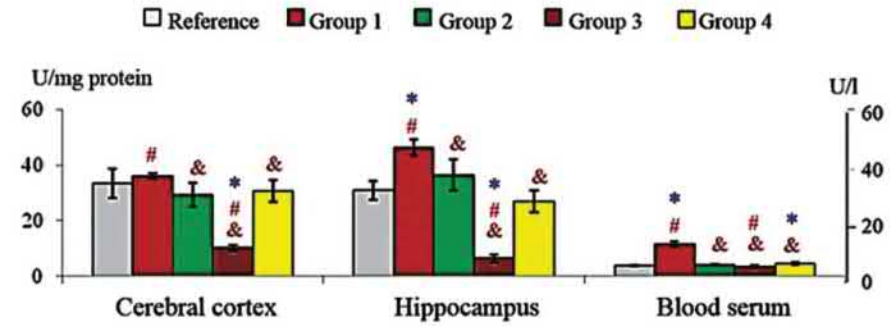


Fig. 1. **Effect of 42_Human β-amyloid peptide and curcumin liposome form on angiotensin-converting activity in brain sections (cerebral cortex and hippocampus) and blood serum of the rats**

Hereinafter: * — $P \leq 0.05$ compared to control (intact animals, $n = 6$); # — $P \leq 0.05$ when comparing the groups 1 (model of Alzheimer's disease, $n = 6$); 2 (sham operated animals, $n = 6$); 3 (nasal therapy of the AD model animals with liposome curcumin, $n = 6$); 4 (nasal therapy of AD model animals with empty liposomes, $n = 6$), respectively; & — $P \leq 0.05$ compared to the group 1 (Alzheimer's disease model, $n = 6$).

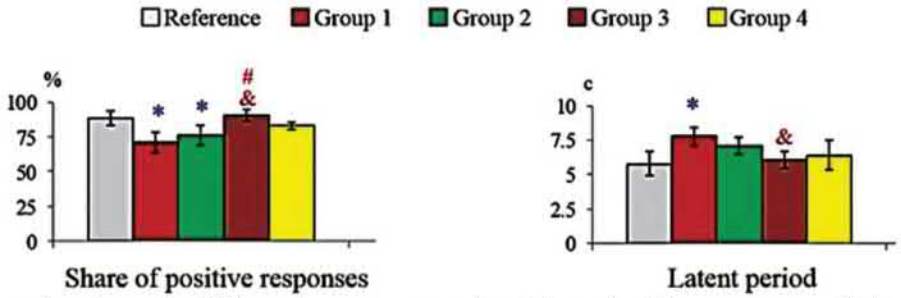


Fig. 2. **Dynamics of mnestic ability and memory parameters (share of positive responses and latent period) in effect of 42_Human β-amyloid peptide and curcumin liposome form therapy in the rats**

Human in hippocampus of the experimental rats causes neuroinflammation specifically and mainly in the spot of injection. But in the brain cerebral cortex the activation of neuroinflammation was also shown, although to lower extent (Table 2). Namely, only the IL-6 level reliably increased by nearly 54%. Specificity of Aβ42_Human inflammatory effect in the brain of the rats was also proved by difference in the levels of the studied cytokines between groups 1 and 2 (Tables 1 and 2).

Effect of liposome curcumin on cytokine levels in hippocampus of the animals was marked by essential suppression of inflammation (Table 1): TNFα level decreased by 56%, IL-6 — by 39% and IL-10 — by 52%, respectively. But not a single cytokine normalized its concentration, unlike in the case with the effect of empty liposomes (Table 1). Effect of CUA as component of liposomes in the cerebral cortex of the rats with AD gave similar suppression of cytokine response (Table 2): TNFα level decreased by 71%, IL-6 — by 67% and IL-10 — by 41%, respectively. The obtained results are in agreement with our previous data for curcumin water solution only for the brain cerebral cortex of the animals with intrahippocampal injection of Aβ42_Human [37]. In hippocampus of the rats with AD model the CUA liposome form showed more intensive suppression of cytokine chain of neuroinflammation compared to its water solution.

The level of peripheral cytokines (TNFα, IL-6 and IL-10 in blood serum) did not reflect neither specific neuroinflammatory effect of 42_Human β-amyloid peptide in the brain of the rats, nor suppression effect of liposome CUA (Table 3). 20–50% rise in TNFα concentration, 54–67% decrease in IL-10 concentration and absence of changes in IL-6 content in blood serum of the rats of all the

Table 1. **Effect of curcumin liposome form on TNFα, IL-6 and IL-10 in hippocampus of the rats with the model of Alzheimer's disease**

Cytokine	Reference $n = 6$	Group 1 $n = 6$	Group 2 $n = 6$	Group 3 $n = 6$	Group 4 $n = 6$
TNFα	50.7±2.1	63.8±3.5*#	46.8±1.9&	28.3±1.7*#&	46.3±2.3&
IL-6	57.3±8.3	72.8±6.8#	98.3±6.8*&	44.7±5.9*&	58.5±8.2
IL-10	130.4±11.0	254.3±16.7*#	152.8±12.9&	122.4±13.4*#&	151.0±12.4&

Note. Hereinafter: the results are represented as $M \pm m$, ng/g of protein.

Table 2. **Effect of curcumin liposome form on TNFα, IL-6 and IL-10 in cerebral cerebral cortex of the rats with the model of Alzheimer's disease**

Cytokine	Reference $n = 6$	Group 1 $n = 6$	Group 2 $n = 6$	Group 3 $n = 6$	Group 4 $n = 6$
TNFα	50.8±2.5	46.2±2.4#	40.6±2.9*&	13.2±0.9*#&	47.1±2.8
IL-6	52.5±4.2	80.8±7.4*	68.5±5.8	26.8±2.0*#&	49.3±3.9&
IL-10	179.5±13.0	150.8±10.6#	206.4±24.2&	89.4±7.6*#&	177.0±12.8&

Table 3. **Effect of curcumin liposome form on TNFα, IL-6 and IL-10 in blood serum of the rats with the model of Alzheimer's disease**

Cytokine	Reference $n = 6$	Group 1 $n = 6$	Group 2 $n = 6$	Group 3 $n = 6$	Group 4 $n = 6$
TNFα	7.9±0.8	9.5±0.6 *	10.7±1.0 *	10.4±0.4 *#	11.9±0.9 *&
IL-6	48.3±10.4	37.5±6.9	53.2±11.3	44.8±7.7	47.0±14.1
IL-10	19.5±2.4	9.8±1.2 *#	6.5±0.9 *	7.0±1.8 *#&	9.3±2.5 *

experimental groups compared to the reference were marked.

The obtained results showed activation of cytokine system in the brain of the rats with AD experimental model (Tables 1, 2). These data are in agreement with other studies on activation of neuroinflammation by Aβ aggregates [38–41]. Aβ deposits are responsible for activation of microglia [38]. Aβ conduces to higher inflammatory response to NFκB stimulation, the nuclear factor which is involved in regulation of ERK (extracellular signal-regulated kinases) and MAPK (mitogen-activated protein kinases) routes which lead to cytokines and chemokines production [39]. Modification of the inflammatory condition of microglia/macrophages plays prominent role in the course of amyloidosis [40].

Nasal therapy of AD model rats with curcumin liposome form was responsible for suppression of ACE activity and cytokine chain of neuroinflammation. Revealed anti-inflammatory activity of CUA resulted in recovery of memory parameters and mnestic functions in the animals. Therefore, the previous assumption that its liposome form may be an efficient anti-inflammatory factor in the effect of exogenous β-amyloid peptide was confirmed by experimental data. This natural polyphenol prevents activation of NFκB transcription nuclear factor suppressing phosphorylation and degradation of IκBα (NFκB inhibitor). Since curcumin effect lies in inhibition of IB kinase (IKK) activation, needed for NFκB activation [42–44], it is just this fact that explains the revealed anti-cytokine effect of curcumin in the experimental animals. The mechanism of curcumin effect on ACE activity is substantiated by the proved suppressor effect of this polyphenol on expression of enzyme gene [45]. Above-mentioned data show high anti-cytokine potential of especially the liposome form of curcumin.

REFERENCES

1. *Minati L., Edginton T., Bruzzone M. G., Giaccone G.* Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am. J. Alzheim. Dis. & Other Dement.* 2009, V. 24, P. 95–121.
2. *Birks J.* Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006, CD005593.
3. *Gotti C., Riganti L., Vailati S., Clementi F.* Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 2006, V. 12, P. 407–428.
4. *Palmer G. C.* Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr. Drug. Targets.* 2001, V. 2, P. 241–271.
5. *Ostrowski S. M., Wilkinson B. L., Golde T. E., Landreth G.* Statins reduce amyloid-beta production through inhibitionof protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* 2007, V. 282, P. 26832–26844.
6. *Tamburri A., Dudilot A., Licea S., Bourgeois C., Boehm J.* NMDA-receptor activation but not ion flux is required for amyloid-beta induced synaptic depression. *PLoS One.* 2013, V. 8, P. e65350.
7. *Takamura A., SatoY., Watabe D., Okamoto Y., Nakata T., Kawarabayashi T., Oddo S., Laferla F.M., Shoji M., Matsubara E.* Sortilin is required for toxic action of Aβ oligomers (AβOs): extracellular AβOs trigger apoptosis, and intraneuronal AβOs impair degradation path ways. *Life Sci.* 2012, V. 91, P. 1177–1186.
8. *Slack B. E., Wurtman R. J.* Regulation of synthesis and metbolism of the amyloid precursor protein by extracellular signals. *Res. Progr. Alzheimer's Dis. Dement.* 2007, V. 2, P. 1–25.
9. *Mattson M. P.* Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004, V. 430, P. 631–639.
10. *Mehan S., Arora R., Sehgal V., Sharma D., Sharma G.* Inflammatory diseases — immunopathology, clinical and pharmacological bases; in Khatami M (ed): *Dementia: A Complete Literature Review on Various Mechanisms Involved in Pathogenesis and an Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. Rijeka, InTech.* 2012, P. 3–19.
11. *Swardfager W., Lanct t K., Rothenburg L., Wong A., Cappell J., Herrmann N.* A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry.* 2010, V. 68, P. 930–941.
12. *Hunter C.A., Timans J., Pisacane P., Menon S., Cai G., Walker W., Aste-Amezaga M., Chizzonite R., Bazan J. F., Kastelein R. A.* Comparison of the effects of interleukin-1α, interleukin-1β and interferon-γ inducing factor on the production of interferon-γ by natural killer. *Eur. J. Immunol.* 1997, V. 27, P. 2787–2792.
13. *Dinarello C. A.* Proinflammatory cytokines. Chest. 2000, V. 118, P. 503–508.
14. *Soscia S. J., Kirby J. E., Washicosky K. J., Tucker S. M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M. A., Goldstein L. E., Duong S., Tanzi R. E., Moir R. D. Bush, Ashley I.* The Alzheimer's disease-associated amyloid β-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 2010, V. 5, P. e9505.
15. *Huber T. S., Gaines G. S., Welborn M. B., Roseberg J. J., Seeger J. M., Moldawer L. L.* Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock.* 2000, V. 13, P. 425–434.
16. *Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G. M., Cooper N. E., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B. L., Finch C. E., Frautschy S., Griffin W. S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I. R., Mcgeer P. L., O'Banion M. K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F. L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T.* Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000, V. 21, P. 383–421.
17. *Stewart W. F., Kawas C., Corrada M., Metter E. J.* Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology.* 1997, V. 48, P. 626 –631.
18. *Shezad A., Lee Y. S.* Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors.* 2013, V. 39, P. 27–36.
19. *Bharti A. C., Takada Y., Aggarwal B. B.* Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-κB ligand-induced NF-κB activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J. Immunol.* 2004, V. 172, P. 5940–5947.
20. *Teiten M. N., Dicato M., Diederich V.* Curcumin as a regulator of epigenetic events. Mol. Nutr. *Food Res.* 2013, V. 57, P. 1619–1629.
21. *Lee W. H., Loo C. Y., Bedawy M., Luk F., Mason R. S., Rohanizadeh R.* Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 2013, V. 11, P. 338–378.
22. *Jackson J. K., Higo T., Hunter W. L., Burt H. M.* The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm. Res.* 2006, 55 (4), 168–175.
23. *Banerjee M., Tripathi L. M., Srivastava V. M., Puri A., Shukla R.* Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen

and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmac. Immunotoxic*. 2003, 25 (2), 213–224.
24. *Kunnumakkara A. B., Anand P., Aggarwal B. B.* Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*. 2008, 269 (2), 199–225.
25. *Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M.* Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res*. 2004, 75 (6), 742–750.
26. *Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambeqaokar S. S., Chen P. P., Kayed R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M.* Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem*. 2005, 280 (7), 5892–5901.
27. *Zhang L., Fiala M., Cashman J., Sayre J., Espinosa A., Mahanian M., Zaghi J., Badmaev V., Graves M.C., Bernard G., Rosenthal M.* Curcuminoids enhance amyloid-beta uptake by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis*. 2006, 10 (1), 1–7.
28. *Shulga S. M.* Obtaining and characteristic of curcumin liposomal form. *Biotechnologia Acta*. 2014, 7 (5), 55–61.
29. *Miners J. S., Baig S., Palmer J., Palmer L. E., Kehoe P. G., Love S.* A β-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008, V. 18, P. 240–252.
30. *Hu J., Igarashi A., Kamata M., Nakagawa H.* Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (Abeta); retards Abeta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J. Biol. Chem*. 2001, 276 (5), 47863–47868.
31. *Hemming M. L., Selkoe D. J.* Amyloid β-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J. Biol. Chem*. 2005, 280 (45), 37644–37650.
32. *Vorobjova T. M.* Role of limbic and reticular systems in selfstimulation. *The federation of American societies for experimental biology*. 1969, V. 70, P. 95–101.
33. *Bures J., Petran M., Zachar J.* Electrophysiological methods in biological research. *Ed. 2 Publishing House*. 1960, 516 p.
34. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951, V. 193, P. 265–275.
35. *Ronca-Testoni S.* Direct spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme. *Clin. Chem*. 1983, V. 29, P. 1093–1096.
36. *Arregui A., Perry E. K., Rossor M., Tomlinson B. E.* Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease increased activity in caudate nucleus and cortical areas. *J. Neurochem*. 1982, V. 38, P. 1490–1492.
37. *Sokolik V. V., Shulga S. M.* Curcumin influence on the background of intrahippocampus administration of β-amyloid peptide in rats. *Biotechnol. acta*. 2015, 8 (3), 78–88.
38. *Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J.* Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med. Princ. Pract*. 2015, V. 24, P. 1–10.
39. *Ridolfi E., Barone C., Scarpini E., Galimberti D.* The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an eye on microglia. *Clin. Dev. Immunol*. 2013, P. 939786.
40. *Boutajangout A., Wisniewski T.* The innate immune system in Alzheimer's disease. *Int. J. Cell. Biol*. 2013, P. 576383.
41. *Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L.* Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull*. 2012, V. 87, P. 10–20.
42. *Aggarwal B. B., Gupta S. C., Sung B.* Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br. J. Pharmacol*. 2013, V. 169, P. 1672–1692.
43. *Jobin C. C., Bradham A., Russo M. P., Juma B., Narula A. S., Brenner D. A., Sartor R. B.* Curcumin blocks cytokine-mediated NF-κB activation andproinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor IB kinase activity. *J. Immunol*. 1999, V. 163, P. 3474.
44. *Pan M. H., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K.* Comparative studies on thesuppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IB kinase and NF-κB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol*. 2000, V. 60, P. 1665.
45. *Fazal Y., Fatima S. N., Shahid S. M., Mahboob T.* Effects of curcumin on angiotensin-converting enzyme gene expression, oxidative stress and anti-oxidant status in thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014, Epub 2014, pii: 1470320314545777.

ВПЛИВ ЛІПОСОМНОЇ ФОРМИ КУРКУМІНУ НА АНГІОТЕНЗИН-ПЕРЕТВОРЮВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ, ЦИТОКІНИ І КОГНІТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ЩУРІВ З МОДЕЛЛЮ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В. В. Соколік[1]
С. М. Шульга[2]

[1]ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України», Харків
[2]ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Метою дослідження було вивчення впливу ліпосомної форми куркуміну на активність ангіотензинперетворювального ензиму, цитокіни і мнестичні властивості щурів з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера. У тварин з інтрагіпокампальним уведенням Aβ42_Human застосовували назальну терапію ліпосомною формою куркуміну. Реєстрували концентрацію цитокінів і активність ангіотензинперетворювального ензиму у відділах головного мозку (лобно-фронтальна кора і гіпокамп) та сироватці крові, а також показники умовно-рефлекторної реакції уникнення. У результаті терапії куркуміном встановлено пригнічення активності цитокінів, ангіотензинперетворювального ензиму та відновлення мнестичних показників у щурів із хворобою Альцгеймера. Назальна терапія ліпосомної форми куркуміну мала наслідком зменшення активності ангіотензинперетворювального ензиму та антицитокінового ефекту в цільових відділах головного мозку (лобно-фронтальна кора і гіпокамп), що сприяло відновленню мнестичних властивостей і пам'яті щурів.

Ключові слова: куркумін, ліпосоми, β-амілоїдний пептид, цитокіни, ангіотензинперетворювальний ензим.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЫ КУРКУМИНА НА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ, ЦИТОКИНЫ И КОГНТИТИВНЫЕ СВОЙСТВА КРЫС С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В. В. Соколик[1]
С.М. Шульга[2]

[1]ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков
[2]ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Целью исследования было изучение влияния липосомной формы куркумина на активность ангиотензин-превращающего энзима, цитокины и мнестические свойства крыс с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера. У животных с интрагипокампальным введением Aβ42_Human применяли назальную терапию липосомной формой куркумина. Регистрировали концентрацию цитокинов и активность ангиотензинпревращающего энзима в отделах головного мозга (лобно-фронтальная кора и гиппокамп) и сыворотке крови, а также показатели условно-рефлекторной реакции избегания. В результате терапии куркумином установлено угнетение активности цитокинов, ангиотензинпревращающего энзима и восстановление мнестических показателей у крыс с болезнью Альцгеймера. Назальная терапия липосомной формой куркумина обусловила уменьшение активности ангиотензинпревращающего энзима и антицитокинового эффекта в целевых отделах головного мозга (лобно-фронтальная кора и гиппокамп), что способствовало восстановлению мнестических свойств и памяти крыс.

Ключевые слова: куркумин, липосомы, β-амилоидный пептид, цитокины, ангиотензинпревращающий энзим.

Journal of
Alzheimer's Disease & Parkinsonism

Sokolik et al., J Alzheimers Dis Parkinsonism 2017, 7:4
DOI: 10.4172/2161-0460.1000357

Research Article OMICS International

Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model

Sokolik VV[1], Berchenko OG[1] and Shulga SM[2]*

[1]*Laboratory of Neurophysiology, Immunology and Biochemistry SE, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*
[2]*Department of Industrial and Food Biotechnology SE, Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

Abstract

The aim of this study was a comparative analysis of the efficacy of nasal therapy of curcumin soluble and liposomal forms of animals with a model of Alzheimer's disease. Cognitive tests and immunity-enzyme analysis of cytokines were completed. On experimental model of Alzheimer's disease in rats (intrahippocampus administration of 15 nM Aβ42_Human) installed more efficient nasal therapy (1 month treatment) of curcumin liposome form (3.5 μg/animal daily) has turned out more efficient compared to its aqueous solution, both in terms of cognitive tests (the portion of the positive responses and latent period of the conditioned reflex reaction elimination) and in neuroinflammation (cytokines content (interleukin-1β, interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor α) in the brain sections: cerebral cortex and hippocampus of the rats with Alzheimer's disease model). The data indicate a high anticytokine potential specifically of the liposomal form of curcumin.

Keywords: Curcumin; Liposome; Alzheimer's disease; Memory; Cytokines; Brain

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease, which is characterised clinically by the progressive loss of short-term memory and cognitive functioning. Major pathological features of an AD brain include the accumulation of extracellular plaques and fibrils with Aβ peptides, intracellular neurofibrillary tangles (NFT), as well as chronic inflammation and widespread synaptic and neuronal loss, leading to brain atrophy and dysfunction [1-3]. With the ageing of many populations worldwide, it is predicted that over the next few decades there will be a marked increase in the number of people with dementia. According to the World Health Organization (WHO), 5% of men and 6% of woman above the age of 60 years are affected with Alzheimer's type dementia worldwide. Current estimations show that 36 million people worldwide have dementia, which is predicted to more than triple to 115 million by 2050 (Figure 1) [4].

The "amyloid cascade hypothesis," in which mutations in amyloid precursor protein, β-secretase (BACE-1), apolipoprotein E, presenilin-1 or presenilin-2 genes lead to increased production of β-amyloid, is now widely considered to contribute to the neurodegeneration seen in AD [5]. Mutations in these genes are linked to some forms of AD [6-8] and although generally responsible for early-onset disease, they have also been reported in some patients with late-onset disease [9,10]. Nevertheless, only about 5% of AD cases are caused by these mutations, and so it seems that there must be other factors that lead to an overproduction and deposition of β-amyloid. The remaining 95% of cases of this neurodegenerative pathology are caused by age-related metabolic disorders: chronic neuroinflammation, oxidative stress, epigenetic alterations and other. Therefore, the main focus of the prevention and treatment of AD may be a correction of nonspecific age-related disorders caused by broad spectrum agents [11,12].

With no current effective disease-modifying treatments available, finding pharmacological/non-pharmacological strategies to halt or slow disease progression is of significant importance. The continuing lack of effective pharmaceutical drugs has also prompted the evaluation of alternative therapeutics, such as nutraceuticals. Extensive studies in the last two decade suggested that curcumin possesses anti-inflammatory, antioxidant, Aβ-lowering agent and Aβ aggregation inhibitor properties; it shows potential as a therapeutic for AD [13-37]. The mechanism for these effects involves modulation of several signaling transduction pathways (Figure 2).

However, curcumin's clinical application is severely limited because of its poor stability under physiological conditions that limits its systemic bioavailability [38,39]. Major reasons contributing to the low plasma and tissue levels of curcumin appear to be due to poor absorption, rapid metabolism, and rapid systemic elimination. Therefore, many technologies have been developed and applied to overcome this limitation and development of nano-sized delivery systems for curcumin, including liposomes, polymeric nanoparticles and micelles, conjugates, peptide carriers, cyclodextrins, solid dispersions, lipid nanoparticles and emulsions [40-46].

Still one problem is physiological barriers (including a blood brain barrier) limiting curcumin absorption after oral or intravenous administrations [47]. This natural polyphenol was more permeable under acidic conditions, but the permeability was substantially below the permeability of highly permeable standards by its non-specific binding. This can be explained by greater stability of keto form of curcumin, which becomes dominant in a tautomeric mixture of keto and enol forms in curcumin's solution. Therefore, the aim of this study was a comparative analysis of the efficacy of nasal therapy of curcumin soluble and liposomal forms of animals with a model of Alzheimer's disease.

***Corresponding author:** Shulga SM, Department of Industrial and Food Biotechnology SE, Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Tel: +38067 4400531; E-mail: shulga5@i.ua

Received May 04, 2017; **Accepted** July 25, 2017; **Published** August 01, 2017

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

Copyright: © 2017 Sokolik VV, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

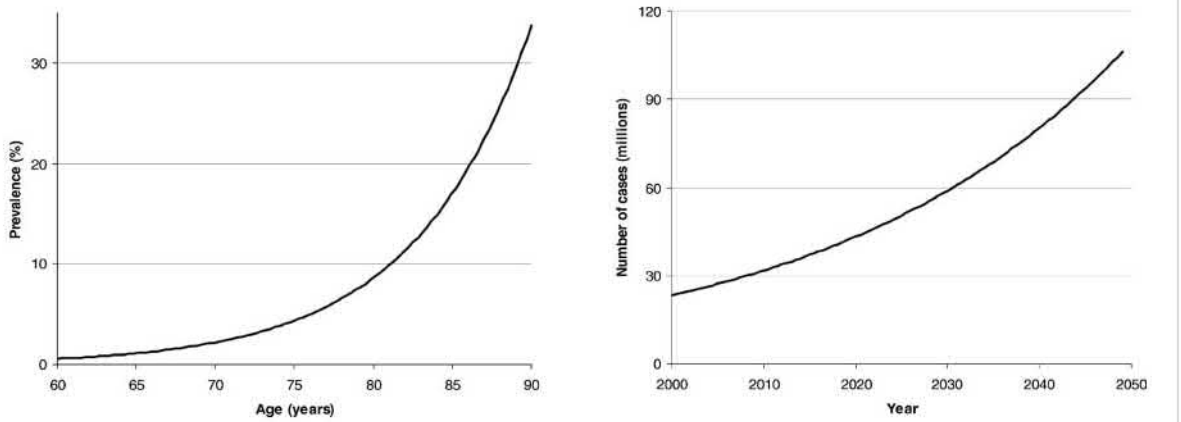


Figure 1: Prevalence of Alzheimer's disease (AD) as a function of age (left) and total number of cases as a function of calendar year (right). Based on data from the Delphi consensus study [4].

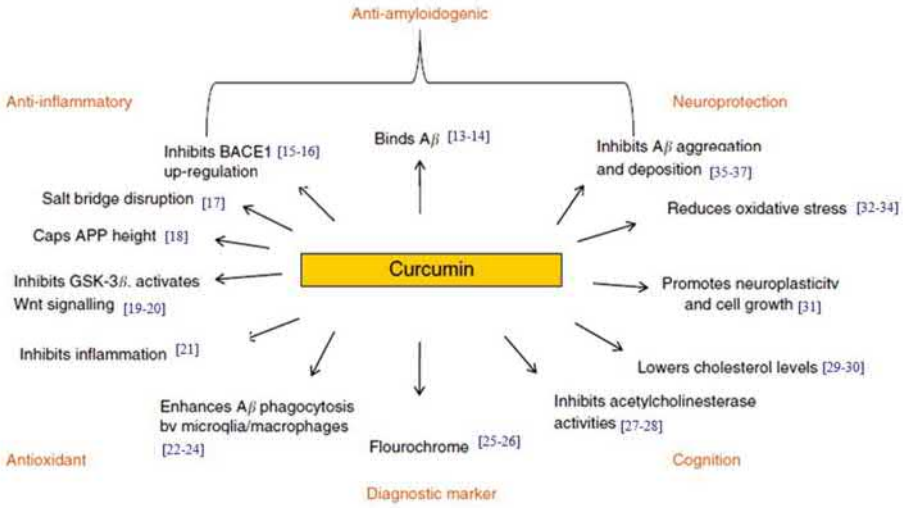


Figure 2: Curcumin: Reported mechanisms of action [1]. The scheme shows the pathways and mechanisms of anti-amyloidogenic, anti-inflammatory, antioxidant, neuroprotective and other effects of curcumin.

Materials and Methods

Study design

The effect of nasal therapy with curcumin in two forms was studied, namely its aqueous solution and its liposomal form (composed of phospholipid/cholesterol liposomes). Experimental protocols were complied with the rules of the European Convention for Protection of Vertebrate Animals used in experiments and for other scientific purposes. The rats (n=60) were randomly distributed into 7 groups. The reference group included the intact animals (n=12); Group 1 included rats 1 month after intrahippocampal injection of Aβ42_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich, USA) – experimental model of AD (n=12); Group 2 included sham-operated animals (n=12); Group 3 included rats with experimental model of AD, who received curcumin aqueous solution of (Sigma-Aldrich, USA) delivered by intranasal administration daily for 1 month (n=6); Group 4 included the animals with experimental model of AD, who received bidistilled water by intranasal administration daily for 1 month (n=6); Group 5 included rats with experimental model of AD, who received liposomal curcumin delivered by intranasal administration daily for 1 month (n=6) and Group 6 included animals with experimental model of AD, who received intranasal administration of empty liposomes daily for 1 month, as well (n=6).

Cognitive tests

Preliminarily, 20 days before a conditioned reflex reaction was formed in all the rats on the basis of non-conditioned reflex elimination [48]. Infallible conditioned reflex responses to metronome sound were

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

considered to be positive results. Next to the positive response portion (number) (in percent, %), the duration of latent period of conditioned reflex reaction elimination was registered in the study (in seconds, s). The animals of all the groups were tested for these values of conditioned reflex reaction elimination after the AD experimental model was formed in them and after intranasal administration of curcumin, respectively.

Experimental model of Alzheimer's disease

Aβ42_Human solved in bidistilled water was aggregated for 24 h at 37°C. Large rough conglomerates of Aβ42_Human were dispersed, using the ultrasonic homogenizer (Musson-1, Russia) for 5 min and sterilized immediately before injection. The effect of β-amyloid peptide 42_Human in homoaggregate form was studied one month after its single injection in the dosage of 15 nM Aβ42_Human (65 μg) to the brain hippocampus of the rats. The volume of the solution: 10 μl per animal. Aβ42_Human solution volume was 10 μl, the rate of introduction of a needle syringe chromatographic – 0.03 μl/s and duration of administration – 5 min. The stereotaxic coordinates of the left hippocampus were determined by the map of the rat brain [49], which corresponds to the distance from the point of intersection of the sagittal seam with bregma (zero point): distally – 2 mm, laterally – 2 mm and in depth – 3.5 mm. Stereotaxic operations in the investigated animals ran under general narcosis using intraperitoneal injections of thiopental, 50 mg/kg of body mass.

Nasal therapy with curcumin

Since curcumin has low solubility in water, its concentrated solution in 96% ethanol was first prepared. Curcumin remained stable in ethanol at the room temperature for three weeks but degraded fast in water at neutral or weak basic pH [50]. Therefore the outgoing curcumin solution was dissolved in the bidistilled water to 0.7 g/l immediately before the nasal administration into the rats in the dosage of 3.5 μg/animal.

To prepare liposomes with curcumin, lecithin/cholesterol was dissolved in the round-bottom flask at ratio 18:1 in 50% ethanol. After the lipid film was formed as a result of the solvent evaporation, 28.85 mM CUA in 5 ml of PBS buffer (10 mM Na_2HPO_4, 1.76 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) was added and thoroughly mixed for suspension of liposomes with curcumin formation [51]. The suspension of empty liposomes was prepared using the similar protocol but at the final stage PBS buffer without CUA was added. Liposome suspension with CUA was dissolved with PBS buffer to 0.7 g/l CUA immediately before nasal administration to the rats in the dose of 3.5 μg/animal. Suspension of empty liposomes was diluted similarly. Daily nasal therapy of the rats with AD experimental model lasted for 1 month. Administration of liposome form curcumin by nasal method is determined by the fact that, unlike peripheral blood circulation, this is the shortest way to the target regions of the rat neocortex. It is known that after entering the body the dissolved curcumin is nearly unable to overcome the hematoencephalic barrier whereas its liposome form is actively and non-specifically entrapped by the formed elements of blood, which requires big doses of the preparation.

After the processing was finished the animals were decapitated. The samples of the cerebral cortex and hippocampus were frozen and stored for further measurement. The tissues of the brain sections were homogenized in Tris buffer (50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged at 14,000 g (RS-6, RF) for 5 min and then the supernatant was collected.

Immunity-enzyme analysis of cytokines

The samples of hippocampus supernatant and cerebral cortex were used to determine cytokines by the ELISA method in accordance with the protocols (Rat ELISA Kits Invitrogen BCM DIAGNOSTICS, USA) for IL-1β, IL-6, IL-10 and TNFα. Assay absorption was read out by GBG Stat FAX 2100 (USA) microplate analyzer at 450 nm with wavelength correction at 630 nm. The ELISA data (μg/l cytokins) were recalculated to the general protein. Concentration of general protein was quantitated by Lowry method [52].

Statistical processing of the study results

The obtained results were statistically processed, the average values and standard deviations being calculated. The statistical analysis of differences was calculated using Student *t*-test. Values at $p<0.05$ were considered significant.

Results and Discussion

The rats with Alzheimer's disease model (Group 1) showed memory impairment in cognitive tests by such indicators as the portion of the positive responses and latent period of the conditioned reflex reaction elimination (Table 1). In particular, the percentage of positive responses decreased and the length of the latent period increased as compared to the intact animals (Reference group). However, the first indicator also decreased in sham-operated rats (Group 2), calling into question its specificity. In addition, the latter did not show any credible changes in the latent period. Therefore, this particular indicator of animal cognitive tests is a sensitive marker of memory impairment at early stages of dementia. The first clinic symptoms of dement changes manifest themselves primarily in the extension of recollection intervals, and later in the impossibility to recall anything at all.

Daily nasal therapy with aqueous solution of curcumin for 1 month in AD model rats (Group 3) recovered only the portion of the positive responses, whereas latent period remained somewhat extended (Table 1). In the reference group, which received only the solvent, (Group 4) the cognitive indicators under study did not improve. Nasal therapy with liposomal form of curcumin (Table 1) within the same period of time led to a specific recovery of both indicators of the conditioned reflex reaction elimination in animals of Group 5, as compared to Group 1 (AD model animals) and Group 6 (nasal therapy of the AD model rats with empty liposomes). In particular: the portion of the positive responses increased by 19% and 9%, but latent period decreased by 28% and 5%, respectively.

Comparison of the effects of nasal therapy with CUA soluble and

Group	Portion of positive responses (%)	Latent periods (seconds, s)
Reference	88.9 ± 1.2	5.8 ± 0.4
Group 1	76.4 ± 3.3 [1)]	7.8 ± 0.1 [1)]
Group 2	71.0 ± 1.2 [1)]	7.1 ± 0.3
Group 3	87.2 ± 2.0 [2) 3)]	6.7 ± 0.2
Group 4	78.4 ± 3.1 [1)]	7.0 ± 0.2 [1)]
Group 5	91.1 ± 3.7 [2) 3)]	6.1 ± 0.3 [3) 4)]
Group 6	83.4 ± 3.4	6.4 ± 0.4

Remark: [1)]$p \le 0.05$ compared to the Reference (intact animals, n=12); [2)]$p \le 0.05$ at comparison of the Group 1 (Alzheimer's disease model, n=12) and Group 2 (sham-operated animals, n=12), Group 3 (nasal therapy of the AD model rats with soluble CUA, n=6) and Group 4 (nasal therapy of the AD model rats with H_2O, n=6) and Group 5 (nasal therapy of the AD model rats with liposomal CUA, n=6) and Group 6 (nasal therapy of the AD model rats with empty liposomes, n=6), respectively; [3)] $p \le 0.05$ compared to the Group 1 (Alzheimer's disease model, n=12); [4)]$p \le 0.05$ at comparison of the Group 3 (nasal therapy of the AD model rats with soluble CUA, n=6) and Group 5 (nasal therapy of the AD model rats with liposomal CUA, n=6)

Table 1: Effect of curcumin soluble and liposomal forms on memory parameters in the rats with Alzheimer's disease model.

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

liposomal forms on the memory of animals with a model of Alzheimer's disease, Table 1 shows that the indicators of cognitive tests in Group 5 (nasal therapy of the AD model rats with liposomal CUA) and Group 3 (nasal therapy of the AD model rats with soluble CUA) differ only by 5% and 10% for the portion of the positive responses and latent period, respectively. However, the difference was in favor of liposomal curcumin. Thus, greater efficacy of nasal therapy with liposomal curcumin was established based on the results of cognitive tests.

To determine the leading mechanism of curcumin action at the molecular level, we investigated its impact on the cytokine link of inflammation in targeted parts of the brain of rats (hippocampus and cerebral cortex), which are responsible for the memory. Since brain neurons form a single neuronal network with projections of the neocortex axons in the zones of the hippocampus, the spread of the inflammatory process is expected when the hippocampus is damaged in the cerebral cortex.

Homoaggregates Aβ42_Human in the hippocampus of rats with Alzheimer's disease model caused chronic neuroinflammation specifically and predominantly at the injection site (Table 2). In particular: hippocampal levels IL-1β and IL-10 in rats with Alzheimer's disease model were increased compared with the control group (by 221% and 111%, respectively) and group 2 (110% and 78%, respectively). In this part of the brain, concentration of IL-6 in rats of group 1 did not differ from the values of intact animals (control group), but was reduced by 44% compared to the concentration of IL-6 in the sham-operated rats. However, the activation of the inflammatory process was also found in the cerebral cortex of the rats, although to a lesser extent: increased levels of IL-1β (by 109%) and IL-6 (by 54%) compared with those of intact animals (control), and increased concentrations of IL-6 (by 29%) and reduced IL-10 (by 31%) compared to sham-operated animals. The content of TNFα in the cerebral cortex and hippocampus of rats of groups 1 and 2 did not differ from the benchmark and among themselves (Table 2). This result confirms the conclusion of previous studies [53], in which it was shown that homoaggregates Aβ40_Human, injected into the cerebral cortex of rats, cause greater cytokine response specifically in the area of administration.

Thus, the predictor and catalyst of AD is the chronication of the nonspecific neuroinflammatory process, which provokes the toxicity of Aβ40/42 aggregates. One of the mechanisms of the pathogenesis of amyloidosis is activation of the cytokine response to a local excess of β-amyloid peptides. On the other hand, an excess of proinflammatory cytokines (IL-1β, TNFα, IL-6) against a background of lack of anti-inflammatory interleukins (IL-10) results in an amyloidogenic processing scenario for amyloid precursor protein and new portions of secreted Aβ as a signal peptide of the inflammatory response.

The results obtained with regard to the cytokine system activation in the brain of rats with Alzheimer's disease model are consistent with other studies on the activation of neuroinflammation with Aβ aggregates [54-56]. Aβ deposits are responsible for the activation of microglia [57]. Aβ enhances the inflammatory response to NFκB stimulation, which is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), leading to the production of cytokines and chemokines [58]. Toll-like receptors (TLR), along with inflammatory cytokine receptors, are important for the regulation of microglial response to Aβ. Modification of microglia inflammatory state plays a leading role in the course of amyloidosis [59]. Generally, neuroinflammation is implicated in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders. In AD, several mediators in the inflammation cascade contribute both to neurodegeneration and to the production and accumulation of the β-amyloid peptide, including proinflammation cytokines, phospho-c-Jun NH_2-terminal kinase (pJNK), Wnt signalling, reactive oxygen species, inducible nitric-oxide synthase-mediated production of reactive NO species, and lipid peroxidation products [60].

The effect of an aqueous solution of CUA in cerebral cortex of rats showed specific inhibition of inflammatory cytokine activation (Table 2): normalized levels of IL-1β and IL-6; TNFα levels decreased by 49% compared to control; concentration of IL-10 did not change. In group 4 (nasal administration of solvent - H_2O) we observed further aggravation of the neuroinflammatory process induced by the intrahippocampal administration Aβ42_Human. Concentrations of IL-1β and IL-10 in this part of the brain increased by 50% and 73%, respectively, for one

Group	IL-1β (ng/g protein)	TNFα (ng/g protein)	IL-6 (ng/g protein)	IL-10 (ng/g protein)
		Cerebral cortex		
Reference	166.3 ± 18.5	50.8 ± 2.5	52.5 ± 4.2	179.5 ± 13.0
Group 1	347.5 ± 11.8 [1)]	46.2 ± 2.4 [2)]	80.8 ± 7.4 [1)]	150.8 ± 10.6 [2)]
Group 2	340.8 ± 13.3 [1)]	40.6 ± 2.9 [1)3)]	68.5 ± 5.8	206.4 ± 24.2 [3)]
Group 3	222.0 ± 16.1 [1)2)3)]	26.1 ± 3.7 [1)2)3)]	45.2 ± 5.7 [2)3)]	133.6 ± 10.2 [1)2)]
Group 4	430.5 ± 20.6 [1)3)]	58.6 ± 2.5 [3)]	79.1 ± 5.6 [1)]	281.3 ± 8.3 [1)3)]
Group 5	-	13.2± 0.9 [1)2)3)4)]	26.8 ± 2.0 [1)2)3)4)]	89.4 ± 7.6 [1)2)3)4)]
Group 6	-	47.1 ± 2.8	49.3 ± 3.9 [3)]	177.0 ± 12.8 [3)]
		Hippocampus		
Reference	174.0 ± 18.8	50.7 ± 2.1	57.3 ± 8.3	130.4 ± 11.0
Group 1	558.0 ± 18.8 [1)2)]	63.8 ± 3.5 [1)2)]	72.8 ± 6.8 [1)2)]	254.3 ± 16.7 [1)2)]
Group 2	365.4 ± 19.1 [1)3)]	46.8 ± 1.9 [3)]	98.3 ± 6.8 [1)3)]	152.8 ± 12.9 [3)]
Group 3	523.6 ± 14.8 [1)2)]	68.0 ± 4.3 [1)2)]	101.1 ± 7.1 [1)2)3)]	362.0 ± 21.1 [1)2)3)]
Group 4	581.3 ± 16.9 [1)]	80.0 ± 7.5 [1)3)]	120.6 ± 11.8 [1)3)]	505.3 ± 20.8 [1)3)]
Group 5	-	28.3 ± 1.7 [1)2)3)4)]	44.7 ± 5.9 [3)4)]	122.4 ± 13.4 [2)3)4)]
Group 6	-	46.3 ± 2.3 [3)]	58.5 ± 8.2 [3)]	151.0 ± 12.4 [3)]

Remark: [1)]$p \le 0.05$ compared to the Reference (intact animals, n=12); [2)]$p \le 0.05$ at comparison of the Group 1 (Alzheimer's disease model, n=12) and Group 2 (sham-operated animals, n=12), Group 3 (nasal therapy of the AD model rats with soluble CUA, n=6) and Group 4 (nasal therapy of the AD model rats with H_2O, n=6) and Group 5 (nasal therapy of the AD model rats with liposomal CUA, n=6) and Group 6 (nasal therapy of the AD model rats with empty liposomes, n=6), respectively; [3)]$p \le 0.05$ compared to the Group 1 (Alzheimer's disease model, n=12); [4)]$p \le 0.05$ at comparison of the Group 3 (nasal therapy of the AD model rats with soluble CUA, n=6) and Group 5 (nasal therapy of the AD model rats with liposomal CUA, n=6)

Table 2: Effect of curcumin soluble and liposomal forms on cytokines content in the brain sections of the rats with Alzheimer's disease model.

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

month of bidistillate nasal therapy. In the hippocampus of animals, the impact of curcumin on cytokine indicators had a similar orientation (Table 2). However, the concentration of any of the cytokines did not normalize, while the levels of IL-6 (49%) and IL-10 (83%) increased compared with the figures earlier this month. But a comparison of cytokines in hippocampus of rats in groups 3 and 4 clearly indicates a specific reduction in levels of IL-1β (by 33%), TNFα (by 24%), IL-6 (34%) and IL-10 (by 99%) due to a depressing effect of curcumin. The anticytokine effect of CUA can be explained by its ability to inhibit the activation of the inflammatory transcription factor NFκB, inhibiting phosphorylation and degradation of IκBα (NFκB inhibitor) [61,62]. Recently discovered a network of routes anti-inflammatory impact of curcumin in conditions of neurotoxicity units of β-amyloid peptide: inhibit cyclooxygenase (COX-2), phospholipases, pJNK, transcription factor AP-1 and NF-κB [63-65], which makes its properties as a potent inhibitor of pro-inflammatory cytokine production [66].

The effect of liposomal curcumin on the cytokines performance in the hippocampus of animals after the intrahippocampal administration of Aβ42_Human was marked with a significant inhibition of inflammation (Table 2): TNFα levels decreased by 56%, IL-6 – by 39% and IL-10 – by 52%, respectively. However, the concentration of cytokines did not normalize. The effect of CUA in the composition of liposomes in cerebral cortex of rats with Alzheimer's disease model showed similar inhibition of cytokine reactions: TNFα levels decreased by 71%, IL-6 – by 67% and IL-10 – by 41%, respectively.

Conclusion

The results obtained coincide with the data on the aqueous solution of curcumin only for cerebral cortex, because the liposomal form of CUA in the hippocampus of rats with Alzheimer's disease model showed a more intense suppression of cytokine level of neuroinflammation compared to its aqueous solution. The above data indicate a high anticytokine potential specifically of the liposomal form of curcumin.

References

1. Goozee KG, Shah TM, Sohrabi HR, Rainey-Smith SR, Brown B, et al. (2016) Examining the potential clinical value of curcumin in the prevention and diagnosis of Alzheimer's disease. Br J Nutr 115: 449-465.
2. Prince M, Jackson J (2009) Alzheimer's Disease International: World Alzheimer Report, Executive Summary. London: Alzheimer's Disease International.
3. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. Annu Rev Neurosci 24: 1121-1159.
4. Ferri CP, Prince M, Brayne C (2005) Global prevalence ofdementia: A Delphi consensus study. Lancet 366: 2112-2117.
5. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. Science 297: 353-356.
6. Goate A, Hardy J (2012) Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. J Neurochem 120: 3-8.
7. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, et al. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1–42/1–40 ratio *in vitro* and *in vivo*. Neuron 17: 1005-1013.
8. Hunt CE, Turner AJ (2009) Cell biology, regulation and inhibition of β-secretase (BACE-1). FEBS J 276: 1845-1859.
9. Cruchaga C, Haller G, Chakraverty S (2012) Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families PloS ONE 7: e31039.
10. Crean WS, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, et al. (2012) Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. Neuroepidemiology 38: 1-17.
11. Potter PE (2013) Curcumin: A natural substance with potential efficacy in Alzheimer's disease. J Exp Pharmacol 5: 23-31.
12. Aggarwal BB, Sung B (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. Trends Pharmacol Sci 30: 85-94.
13. Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ (2007) Curcumin labels amyloid pathology *in vivo*, disrupts existing plaques and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. J Neurochem 102: 1095-1104.
14. Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, Tei M, Makibuchi T, et al. (2012) Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathyin the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. J Vet Med Sci 74: 51-57.
15. Liu H, Li Z, Qiu D (2010) The inhibitory effects of different curcuminoids on β-amyloid protein, β-amyloid precursor protein and β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. Neurosci Lett 485: 83-88.
16. Wang X, Kim JR, Lee SB, Kim YJ, Jung MY, et al. (2014) Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease Drosophila models. BMC Complement Altern Med 14.
17. Mithu VS, Sarkar B, Bhowmik D, Das AK, Chandrakesan M, et al. (2014) Curcumin alters the salt bridge-containing turn region in amyloid β(1-42) aggregates. J Biol Chem 289: 11122-11131.
18. Fu Z, Aucoin D, Ahmed M, Ziliox M, Van Nostrand WE, et al. (2014) Capping of aβ42 oligomers by small molecule inhibitors. Biochemistry 53: 7893-7903.
19. Olivia CA, Vargas JY, Inestrosa NC (2013) Wnt signaling: Role in LTP, neural networks and memory. Ageing Res Rev 12: 786-800.
20. Parr C, Mirzaei N, Christian M, Sastre M (2015) Activation of the Wnt/beta-catenin pathway represses the transcription of the beta-amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE-1) via binding of T-cell factor-4 to BACE1 promoter. FASEB J 29: 623-635.
21. Shi X, Zheng Z, Li J, Xiao Z, Qi W, et al. (2015) Curcumin inhibitsAbeta-induced microglial inflammatory responses *in vitro*: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. Neurosci Lett 594: 105-110.
22. Zhang L, Fiala M, Cashman J, Sayre J, Espinosa A, et al. (2006) Curcuminoids enhance amyloid-beta uptake by macrophages of Alzheimer's disease patients. J Alzheimers Dis 10: 1-7.
23. Fiala M, Liu PT, Espinosa-Jeffrey A, Rosenthal MJ, Bernard G, et al. (2007) Innate immunityand transcription of MGAT-II and toll-like receptors inAlzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin. Proc Natl Acad Sci USA 104: 12849-12854.
24. Masoumi, Goldenson B, Ghirmai S, Avagyan H, Zaghi J, et al. (2009) 1 alpha, 25-Dihydroxy vitamin D3 interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. J Alzheimers Dis 17: 703-717.
25. KK Cheng, PS Chan, S Fan, SM Kwan, KL Yeung, et al. (2015) Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI). Biomaterials 44: 155-172.
26. Patil R, GangalumPR, Wagner S, Portilla-Arias J, Ding H, et al. (2015) Curcumin targeted, polymalic acid-based MRI contrast agent for the detection of abeta plaques in Alzheimer's disease. Macromol Biosci 15: 1212-1217.
27. Ahmed T, Gilani AH (2009) Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease. Pharmacol Biochem Behav 91: 554-559.
28. Peeyush KT, Antony S, Sonan S, Kuruvilla KP, George N, et al. (2011) Role of curcuminin the prevention of cholinergic mediated cortical dysfunctions in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Cell Endocrinol 331: 1-10.
29. Kim M, Kim Y (2010) Hypocholesterolemic effects of curcumin via up-regulation of cholesterol 7α-hydroxylase inrats fed a high fat diet. Nutr Res Pract 4: 191-195.
30. Tu Y, Sun D, Zeng X, Yao N, Huang X, et al. (2014) Piperine potentiates the hypocholesterolemic effect of curcumin in rats fed on a highfat diet. Exp Ther Med 8: 260-266.

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

31. Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, Kim MS (2008) Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. J Biol Chem 283: 14497-14505.

32. Huang HC, Chang P, Dai XL, Jiang ZF (2012) Protective effects of curcumin on amyloid-beta-induced neuronal oxidative damage. Neurochemical Research 37: 1584-1597.

33. Xiao Z, Zhang A, Lin J, Zheng Z, Shi X, et al. (2014) Telomerase: A target for therapeutic effects of curcumin and a curcumin derivative in Abeta insult *in vitro*. PLoS ONE 9: e101251.

34. Belviranli M, Okudan N, Atalik KEN, Öz M (2013) Curcuminim proves spatial memeory and decreases oxidative damagein aged female rats. Biogerontology 14: 187-196.

35. Zhang C, Browne A, Child D, Tanzi RE (2010) Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. J Biol Chem 285: 28472-28480.

36. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, et al. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques and reduces amyloid *in vivo*. J Biol Chem 280: 5892-5901.

37. Wang YJ, Thomas P, Zhong JH, Bi FF, Kosaraju SH, et al. (2009) Consumption of grape seed extract prevents amyloid-β deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. Neurotox Res 15: 3-14.

38. Chakraborti S, Dhar G, Dwivedi V, Das A, Poddar A, et al. (2013) Stable and potent analogues derived from the modification of the dicarbonyl moiety of curcumin. Biochemistry 52: 7449-7460.

39. Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, et al. (2013) Curcumin and its derivatives: Their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. Curr Neuropharmacol 11: 338-378.

40. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE, (2014) Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. Biomaterials 35: 3365-3383.

41. Ranjan P, Mukerjee A, Helson L, Gupta R, Vishwanatha JK (2013) Efficacy of liposomal curcumin in a human pancreatic tumor xenograft model: Inhibition of tumor growth and angiogenesis. Anticancer Res 33: 3603-3609.

42. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB, (2007) Bioavailability of curcumin: Problems and promises. Mol Pharm 4: 807-818.

43. Mourtas S, Lazar AN, Markoutsa E, Duyckaerts C, Antimisiaris SG, (2014) Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease. Eur J Med Chem 80: 175-183.

44. Mohanty C, Sahoo SK (2010) The *in vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. Biomaterials 31: 6597-6611.

45. Ghosh M, Singh AT, Xu W, Sulchek T, Gordon LI, et al. (2011) Curcumin nanodisks: Formulation and characterization. Nanomedicine 7: 162-167.

46. NK Gupta, VK Dixit (2011) Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline. J Pharm Sci 100: 1987-1995.

47. Berginc K, Trontelj J, Basnet NS, Kristl A (2012) Physiological barriers to the oral delivery of curcumin. Pharmazie 67: 518-524.

48. Vorobjova TM (1969) Role of limbic and reticular systems in self stimulation. Neurosci Behav Physiol 70: 95-101.

49. Bures J, Petran M, Zachar J (1960) Electrophysiological methods in biological research. Ed.2 Publishing House.

50. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, et al. (1997) Chengetal stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J Pharm Biomed Anal 15: 1867-1876.

51. Sokolik VV, Shulga SM (2015) Effect of curcumin liposomal form on angiotensin converting activity, cytokines and cognitive characteristics of the rats with Alzheimer's disease model. Biotechnologia Acta 8: 48-55.

52. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

53. Sokolik VV, Maltsev AV (2015) Cytokines neuroinflammatory reaction to the action of β-amyloid 1-40 administered to rats in homoaggregated and liposomal forms. Biochemistry, (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry 9: 355-361.

54. Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Res Bull 87: 10-20.

55. Salminen, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T (2009) Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. Prog Neurobiol 87: 181-194.

56. Combs K, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001) β-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. J Neurosci 21: 1179-1188.

57. Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Talebi M, Farhoudi M, et al. (2015) Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease. Med Princ Pract 24: 1-10.

58. Ridolfi E, Barone C, Scarpini E, Galimberti D, (2013) The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: An eye on microglia Clin Dev Immunol 2013: 939786.

59. Boutajangout A, Wisniewski T (2013) The innate immune system in Alzheimer's disease. Int J Cell Biol 2013: 576383.

60. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 21: 383-421.

61. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B (2013) Curcumin: An orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. Br J Pharmacol 169: 1672-1692.

62. Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK (2000) Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through downregulation of IB kinase and NF-κB activation in macrophages. Biochem Pharmacol 60:1665-1676.

63. Park SY, Kim DS (2002) Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimers disease. J Nat Prod 65: 1227-1231.

64. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, et al. (2005) Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-B as potential targets. J Immunol 174: 8116-8124.

65. Weber WM, Hunsaker LA, Gonzales AM, Heynekamp JJ, Orlando RA, et al. (2006) TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin. Biochem Pharmacol 72: 928-940.

66. Begum N, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, et al. (2008) Curcumin structure-function, bioavailability and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther 326:196-208.

Citation: Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM (2017) Comparative Analysis of Nasal Therapy with Soluble and Liposomal Forms of Curcumin on Rats with Alzheimer's Disease Model. J Alzheimers Dis Parkinsonism 7: 357. doi: 10.4172/2161-0460.1000357

OMICS International: Open Access Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700+ Open Access Journals
- 50,000+ editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at major indexing services
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: http://www.omicsonline.org/submission/

BIOTECHNOLOGIA ACTA, V. 8, No 3, 2015

UDC 612.015:616.153.96:616.894 doi: 10.15407/biotech8.03.078

INFLUENCE OF CURCUMIN ON CYTOKINES CONTENT AND ANGIOTENSIN-CONVERTING ACTIVITY UNDER INTRAHIPPOCAMPUS ADMINISTRATION OF β-AMYLOID PEPTIDE IN RATS

V. V. Sokolik[1]
S. M. Shulga[2]

[1]State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv
[2]State Institution "Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine", Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Received 16.06.2015

The purpose of this study was to investigate the effect of curcumin on cytokine response and angiotensin-converting activity in terms of intrahippocampus administration of β-amyloid peptide in rats. Animals with experimental model of Alzheimer's disease received nasal therapy aqueous solution of curcumin. Recorded concentration of cytokines (interleukin-1β, interleukin-6, interleukin-10, tumor necrosis factor-α) and angiotensin-converting activity in the parts of the brain (cerebral cortex and hippocampus) and blood serum, as well as indicators of conditional reflex escapers action. Install a reduction in cytokine response intrahippocampus administering Aβ42_Human and angiotensin-converting activity inhibition in the brain but not in the blood serum of animals under the action of curcumin. Recorded improvement in cognitive performance in rats with a model of Alzheimer's disease as a result of curcumin therapy. Nasal treatment with an aqueous solution of curcumin has anti-inflammatory effect in the targeted parts of the brain (cerebral cortex and hippocampus), but inhibits angiotensin-converting activity.

Key words: curcumin, β-amyloid peptide, cytokines, angiotensin-converting enzyme, Alzheimer's disease.

Curcumin (diferuloylmethane) is a natural polyphenol which manifests compound effect on the body homeostasis; it negatively influences the NF-kB and AP-1 transcription factors, suppresses expression of cyclooxygenase-2, lipoxygenase, NO-synthase, matrix metalloproteinase-9, urokinase of plasminogen type activator, tumor necrosis factor (TNF), chemokines, molecules of cell adhesion and cycline D1; it inhibits expression of growth factor receptors and activity of stress-associated proteinkinase (JNK), protein tyrosine kinases, as well as other protein serine/threonine kinases [1–3]. Curcumin also acts as inhibitor of DNA-methyltransferase, therefore it is regarded as DNA hypomethylating agent. It establishes balance between activity of histone acetyltransferase and histone deacetyltransferase thus influencing the expression of certain genes. At last, curcumin modulates activity of micro-RNAs and their numerous target genes [4–5]. The above-mentioned effects of curcumin are accumulated in its anti-oxidation, anti-inflammation, anti-tumor and anti-amyloidogenic properties [6–11].

Considered recently as one of probable Alzheimer's disease (AD) factors is aggregation of β-amyloid peptide (Aβ) to fibrils or deposits as the main pathogenetic event [12–15]. In particular, several studies showed that Aβ is essentially accumulated in the brain areas (hippocampus and cortex), which conduce to obtaining and processing of information, and memory [16–18]. This peptide is formed during amyloidogenic processing of amyloid protein precursor (APP) [19–21]. In a non-amyloidogenic way the full-size APP is decomposed by α- and γ-secretases within Golgi apparatus and plasmatic membrane without forming the β-amyloid peptide. Back internalization of a certain part of APP from the plasmatic membrane ant its transport towards the late endosomes results in β- and γ-secretase-associated separation of Aβ isoforms, 38 to 43 amino acid residues long [22]. The role of switch between non-amylodogenic and amyloidogenic ways of APP processing is

played by various factors: excess of APP or the rate of its phosphorylating, intensity of expression of SORL1 gene of the receptor to apolipoprotein E, presence of mutations in APP and presenilins [23–27].

Endogenic Aβ is a critical player in the synaptic plasticity memory of the central nervous system in norm [28–30]. It was shown that at low (picomolar) concentrations Aβ may act as a trophic signal and modulator of the synaptic activity [31–33]. Besides, Aβ may function as anti-oxidant due to its capability to bond the oxide-reduced metals, and as chelating agent [34–36]. Aβ is important for development of neurons, their plasticity and survival due to its integral interaction with membranes, support of structural integrity of hematoencelphalic barrier (HEB); it has anti-microbe properties and modulates the transport of Ca^{2+} through membranes [37–41].

At high (nanomolar and micromolar) concentrations of Aβ, the neurotoxic aggregates are formed: oligomers or fibriles, amyloidosis and cell death [42–44]. The mechanism due to which the β-amyloid peptide causes damage and death of neurons lies in generations of the oxygen active forms in the course of own aggregation. At the same time on the neuron membranes, peroxide oxidation of lipids is activated and adenosine triphosphatase function is impaired. As a result, Aβ conduces to depolarization of the synaptic membranes, excess input of Ca^{2+} and mitochondrial insufficiency [45–47]. All those processes are concurrent with non-specific inflammation response which goes chronic, and induce APP synthesis and its processing in terms of amyloidogenic scenario [48–50].

The approaches to amyloidosis therapy of Alzheimer's disease which are concentrated on suppression of production and aggregation of Aβ [51–53] or symptomatic therapy [54–58] are low-efficient, therefore correction of the chronic inflammation which provokes excess and aggregation of Aβ, may have positive effect. It was demonstrated that the inflammation process at AD is accompanied with increase in peripheral concentration of cytokines — interleukin-1β (IL-1β), interlukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and higher levels in transforming growth factor-β (TGF-β) in spinal liquid [60]. On the other side, the cytokines, as well as Aβ, are mediators of congenital immunity [59, 39]. They implement their effect through the receptor activation of intracellular signals, which results in translocation of NFκB to the nucleus and activation of protein synthesis de novo [60–61]. However, the existing anti-cytokine therapy is not efficient for amyloidosis, except for anti-inflammation effect IL-10 [62–63]. The Aβ aggregation process is due to the impairment of the balance between its production and degradation. One of the systems supporting the low Aβ level in tissues is zinc metalloproteinases [64–65]. Belonging to them is also the angiotensin-converting enzyme (ACE), (КF 3.4.15.1), which is involved in regulation of arterial tension, exchange of neuropeptides, protection and immunity functions of the body [66–68]. This enzyme (mainly its C-domain) separates the C-end dipeptides from oligopeptides of various structure which have a free carboxyl group. But ACE react with Aβ only by N-domain and decomposes the peptide bonds R5–H6 or D7–S8 [68]. ACE is a I type integral membrane glycoprotein which is released to blood circulation by zinc metalloesterase at the speed of 2% per hour, therefore it functions both in bonded and dissolved form. The conclusions of the studies of ACE1 gene polymorphism and its inhibitors state that decrease of ACE activity is associated with AD risk and accumulation of Aβ [69–70].

The purpose of this study was to investigate the effect of curcumin on cytokine response and angiotensin-converting activity in terms of intrahippocampus administration of β-amyloid peptide in rats.

Materials and Methods

Study Design

The study involved 30 mail mature rats weighing 200 to 250 grams. All the animals were kept at 12-hour light-dark cycle, standard feed for rodents and tap water. Experimental protocols complied with the rules of the European Convention for Protection of Vertebrate Animals used in experiments and for other scientific purposes (Strasbourg, 1986).

The rats were randomly distributed between 5 groups (6 animals each). The reference group included the intact animals. Group 1 — the rats 1 month after intrahippocampal injection of Aβ42_Human (Human Amyloid β Protein Fragment 1-42, Sigma-Aldrich, USA) — experimental model of AD; Group 2 — false-acts animals; Group 3 — the rats with experimental model of AD, which daily received the nasal therapy with aqueous solution of curcumin (Sigma-Aldrich, USA) for 1 month and Group 4 — the animals with experimental model of AD which daily received

the nasal therapy of the solvent (bidistilled water) for 1 month.

Cognitive Tests

Preliminarily, for 20 days in all the rats the conditioned reflex reaction on the basis of non-conditioned reflex elimination was formed [71]. As positive result were considered the infallible conditioned reflex responses to the sound of metronome. Next to the portion of the positive responses (in per cent), registered in the study was the duration of the conditioned reflex reaction elimination latent period in seconds. The animals of all the groups were tested for these values of conditioned reflex reaction elimination after they were formed the AD experimental model and curcumin or solvent therapy respectively.

Experimental Model of Alzheimer's Disease and Curcumin Therapy

Aβ42_Human solved in bidistilled water was aggregated for 24 hours at 37 °C. Large rough conglomerates of Aβ42_Human were dispersed, using the ultrasonic homogenizer (Musson-1, Russia) for 5 min and sterilized immediately before injection. The effect of β-amyloid peptide 42_Human in homoaggregate form was studied one month after its single injection in the dosage of 15 nM Aβ42_Human (65 micrograms) to the brain hippocampus of the rats. The volume of the solution: 10 microliters per animal. The stereotaxic coordinates of the left hippocampus were determined by the map of the rat brain [72], which corresponds to the distance from the point of intersection of the sagittal seam with bregma (zero point): distally — 2 mm, laterally — 2 mm and in depth — 3.5 mm. Stereotaxic operations in the investigated animals ran under general narcosis using intraperitoneal injections of thiopental, 50 mg/kg of body mass.

Since curcumin has low solubility in water, its concentrated solution was first prepared in 96% ethanol. Curcumin remained stable in ethanol at the room temperature for three weeks but degraded fast in water at neutral or weak basic pH [73]. Therefore the outgoing curcumin solution was dissolved in the bidistilled water to 0.7 g/l immediately before the nasal injection into the rats in the dosage of 3.5 μg/animal.

After the processing was finished the animals were decapitated. The samples of the cerebral cortex and hippocampus were frozen and stored for further measurement. The blood was taken and centrifuged at 1000g (OPN-3, Russia) for 20 min. The serum was collected, frozen and stored. The tissues of hippocampus and cerebral cortex were homogenized in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged at 14,000g (RS-6, Russia) for 5 min and then the supernatant was collected.

Immunity-Enzyme Analysis of Cytokines

The samples of hippocampus supernatant and cerebral cortex and blood serum were used to determine cytokines by the immunity-enzyme analysis (IEA) in accordance with the instructions (Rat ELISA Kits Invitrogen BCM DIAGNOSTICS, USA) for IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α. The optical density was read out by GBG Stat FAX 2100 (USA) microplate analyzer at 450 nm with wavelength correction (630 nm). The data of the Immunity Enzyme Analysis (μg/l cytokins) were recalculated to the general protein or expressed in ng/l blood serum. In the figures the obtained data are represented in percentage to the reference group levels. The concentration of the general protein was determined by the Lowry method [74].

Kinetic Test of ACE Activity

ACE activity was determined by kinetic method [75]. Used as substrate was the FAPGG short peptide, from which under action of ACE GG dipeptide was separated and transformed into the hippuric acid. Decrease of the sample optical density at 10 min incubation and T = 37 °C was measured at the wavelength of 340 nm. ACE activity (E_{ACE}) was calculated using the following equation:

$$E_{ACE} = \frac{\Delta A_{sample}}{\Delta A_{calibrator\ hippuric\ acid}} E_{calibrator},$$

where ΔA — decrease of optical density at 10 min incubation and T = 37 °C;

$E_{calibrator} = 82{,}1$
(protocol BÜHLMANN ACE colometric kit, Switzerland).

ACE activity was expressed in the activity units (U/l), which corresponds to the quantity of the ACE enzyme which separates 1 μM of hippuric acid at 37 °C per 1 min per liter for blood serum and per mg protein for the brain areas (cerebral cortex and hippocampus).

Statistical Processing of the Study Results

The obtained results were statistically processed, the average values and standard

deviations being calculated. The statistical analysis of differences was calculated using Student *t*-test comparing the groups 1, 2, 3 and 4, as well as comparing to the reference levels. The values of $P < 0,05$ were considered as significant.

Results and Discussion

Specificity of cytokine response at chronic neuroinflammation from intrahippocampal injection of β-amyloid peptide 42_Human (experimental model of AD) in rats

The animals with the experimental model of AD (Group 1) did not manifest any essential differences in the concentration of inflammation cytokines in blood serum, compared to the reference group. Table 1 shows that only the concentration of anti-inflammation IL-10 in serum is lower by 54%. The similar trends were registered in the group 2 (false-acts animals). Therefore, the level of the investigated cytokines in the blood serum does not reflect any specific effect of β-amyloid peptide 42_Human in the brain of the rats and represents the result of intracerebral intervention.

The study of cytokines in the cerebral cortex of the rats with the model of Alzheimer's disease (group 1) showed increase in the levels of IL-1β (by 109%) and IL-6 (by 54%) compared to the respective levels of the intact animals (reference), and the increase in concentrations of IL-6 (by 29%) and decrease of IL-10 (by 31%) compared to the false-acts animals (Fig. 1).

The content of TNF-α in the cerebral cortex and hippocampus of the rats in the groups 1 and 2 was not different from the reference levels and between each other.

The hippocampal levels of IL-1β and IL-10 in the rats with experimental model of AD were higher compared to the reference group (by 221% and 111%, respectively) and group 2 (by 110% and 78%, respectively). In this part of the brain the IL-6 concentration in the

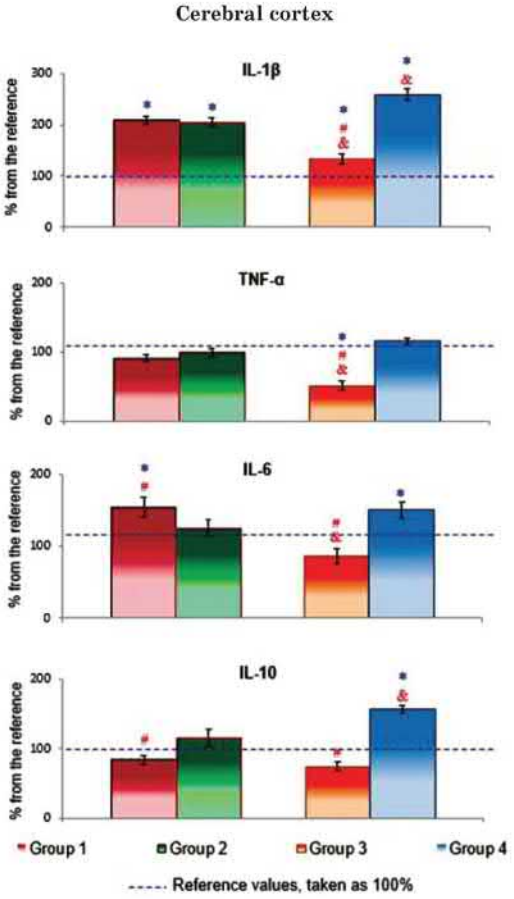


Fig. 1. **Effect of Aβ42_Human homoaggregates and curcumin therapy on the level of cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10) in the brain cerebral cortex of the rats**

The results are given in% from the reference as $M \pm m$. * — $P \le 0.05$ compared to the reference; # — $P \le 0.05$ at comparison of the groups 1 and 2 and 3 and 4, respectively; & — $P \le 0.05$ compared to the group 1 (experimental model of AD).

Table 1. **Effect of β-amyloid peptide 42_Human homoaggregates and curcumin on IL-1β, TNF-α, IL-6 and IL-10 in blood serum of the investigated rats**

Cytokine	Reference (ng/l)	Group 1 (ng/l)	Group 2 (ng/l)	Group 3 (ng/l)	Group 4 (ng/l)
IL-1β	17.2±1.2	16.8±1.1	15.7±0.6	20.9±2.3*#&	16.2±1.2
TNF-α	7.9±0.8	9.5±0.6*	10.7±1.0*	10.3±1.4*#	13.0±1.2*&
IL-6	4.8±1.0	3.7±0.6	5.3±1.1	1.8±0.5*&	1.8±0.3*&
IL-10	3.9±0.4	1.8±0.2*	1.3±0.2*#	4.0±0.5#&	1.6±0.2*

The results are presented as $M \pm m$;
* — $P \le 0.05$ compared to reference;
# — $P \le 0.05$ at comparison of the groups 1 and 2 and 3 and 4, respectively;
& — $P \le 0.05$ compared to group 1 (experimental model of AD).

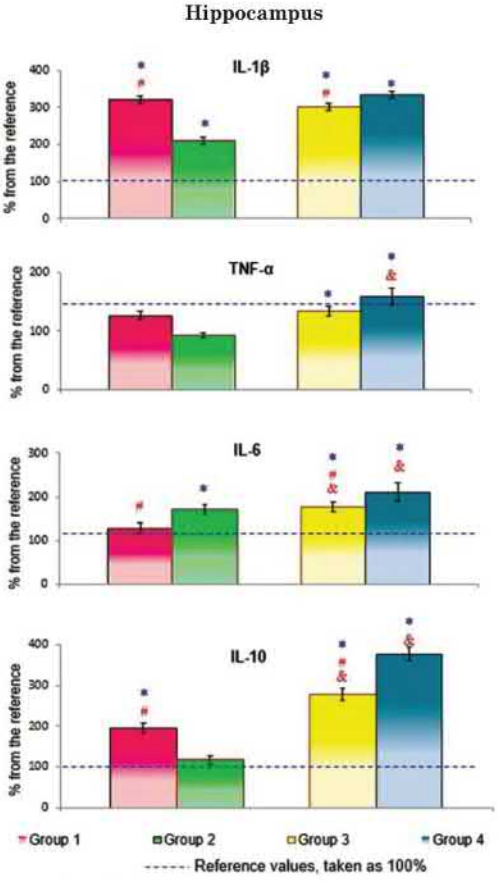


Fig. 2. **Effect of Aβ42_Human homoaggregates and curcumin therapy on the level of cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-10) in the brain hippocampus of the rats**

The results are given in% from the reference as $M \pm m$. * — $P \le 0.05$ compared to the reference; # — $P \le 0.05$ at comparison of the groups 1 and 2 and 3 and 4, respectively; & — $P \le 0.05$ compared to the group 1 (experimental model of AD).

rats from group 1 was not different from the values of the intact animals, but was lower by 44% against the IL-6 concentration in the false-acts rats (Fig. 2). These data show that Aβ42_Human homoaggregates in the hippocampus of the rats with AD experimental model caused chronic neuroinflammation specifically and mainly in the place of injection. But manifested also in the brain cerebral cortex of these rats was inflammation activation, although to lower extent. This result confirms the conclusion of the study [76], where it was shown that Aβ40_Human homoaggregates injected into the brain cerebral cortex of the rats cause higher cytokine response just in the area of the injection.

Increase in ACE activity and memory suppression induced by Aβ42_Human

Table 2 shows the data about increase in ACE activity in the hippocampus and blood serum at intracerebral action of Aβ42_Human.

This is explained first of all by the induction of ACE synthesis with local excess of the substrate (β-amyloid peptide). Probability of this assumption is shown by the data of our studies [76] and the studies [77–78].

Intrahippocampal injection of the Aβ42_Human homoaggregates caused suppression of the elimination conditioned reflex reaction in the rats of group 1. The study of the cognitive capabilities and memory showed decrease in the portion of the positive responses and increase in the latent period for these animals compared to the rats of the reference group (Fig. 3). The portion of the positive responses in the rats with AD experimental model was not different from the level of the false-acts animals, which describes the consequences of the intracerebral intervention.

The obtained results showed presence of the cytokine system activation in the brain of the rats with AD experimental model (Fig. 1, 2). These data are in agreement with

Table 2. **Effect of β-amyloid peptide 42_Human homoaggregates and curcumin on ACE activity in the blood serum and brain sections of the rats**

Item / Group	Blood serum U/l	Frontal cortex U/mg protein	Hippocampus U/mg protein
Reference	3.8±0.2	33.3±5.2	30.9±3.3
Group 1	11.5±1.0*&	36.1±0.8&	46.2±2.8*&
Group 2	4.2±0.3	29.3±4.1	36.5±5.6
Group 3	6.3±0.8*	18.5±2.1*&	22.2±1.7*&
Group 4	5.5±0.6*	31.8±4.4	81.8±8.3*

* — $P \le 0{,}05$ compared to the reference;
& — $P \le 0{,}05$ at comparison of the groups 1 and 2 and 3 and 4, respectively.

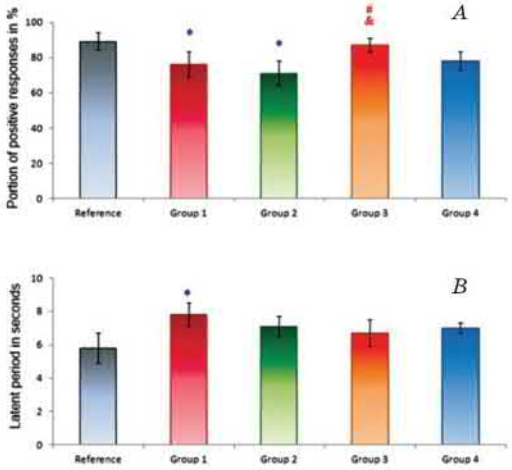


Fig. 3. **Changes in the portion of positive responses (*A*) and latent periods (*B*) during action of the β-amyloid peptide 42_Human homoaggregates and curcumin therapy in the rats**
The results are given as $M \pm m$. * — $P \le 0.05$ compared to the reference; # — $P \le 0.05$ at comparison of the groups 1 and 2 and 3 and 4, respectively; & — $P \le 0.05$ compared to group 1 (AD experimental model).

other investigations of the neuroinflammation activation by Aβ aggregates [79–84]. Aβ deposits are responsible for microglia activation [79]. Aβ conduces to increase in inflammatory response to NF-κB stimulation, which is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and mitogen-activated proteinkinase (MAPK), leading to production of cytokines and chemokines [80]. Toll-like receptors (TLR), similar to the receptors of inflammatory interleukins IL-1 and TNF, are important for regulation of microglia response to Aβ. Modification of the inflammatory state of microglia/macrophage plays prominent role in the course of amyloidosis [81].

Chronic neuroinflammation induced by injection of Aβ42_Human into hippocampus, caused changes in the levels of TNF-α and IL-10 in blood serum (Table 1), and lower cognitive capabilities and memory in the rats (Fig. 3). So, hyperproduction of cytokines may play the role of implementing mechanism at the first stages of amyloidosis and dementia. Further, the detected increase in ACE activity in response to the injection of β-amyloid peptide into hippocampus did not prevent from lower values of the cognitive tests with the investigated animals.

Dualism of curcumin effects in the rats with AD experimental model

Daily curcumin therapy of the rats with AD model for 1 month caused increase in the levels of inflammatory cytokines: IL-1β (by 22%) and TNF-α (and 30%) and decrease in the level of ambivalent IL-6 (by 38%) in blood serum compared to the reference values (Table 1). In group 4 (nasal injection of bidistillate instead of curcumin solution into the rats with AD experimental model) the IL-1β content remained unchanged but dynamics of TNF-α and IL-6 concentrations coincided with group 3. Curcumin specifically restored the concentration of anti-inflammatory IL-10 in blood serum of the rats, contrary to the effect of bidistilled water. It may be noted that in case of curcumin therapy the cytokine response is activated in the blood circulation of the investigated rats.

The curcumin effect in the cerebral cortex gave specific inhibition of cytokines (Fig. 1). Under action of curcumin the levels of IL-1β and IL-6 were normalized; TNF-α level dropped by 49%, compared to the reference; IL-10 concentration did not change but was not different from the reference. Observed in group 2 was further aggravation of the neuroinflammatory process induced by intrahippocampal injection of β-amyloid peptide 42_Human. Concentrations of IL-1β and IL-10 in this brain part increased by 50% and 73%, respectively, during one month of the bidistillate nasal therapy.

In hippocampus of the animals curcumin effect on cytokine values had the similar trend (Fig. 2). But not a single cytokine normalized its concentration, on the contrary the level of IL-6 (by 49%) and IL-10 (by 83%) increased compared to the values at the beginning of the month. But when the hippocampus cytokine values are compared in the groups 3 and 4, the specific suppression becomes understandable concerning the levels of IL-1β (by 33%), TNF-α (by 24%), IL-6 (by 34%) and IL-10 (by 99%) caused by curcumin effect. The detected anti-inflammatory activity of curcumin resulted in restoration of the memory values, in particular the portion of the positive responses of the animals (Fig. 3).

Therefore the previous assumption that curcumin may be efficient anti-inflammatory factor in case of exogenous β-amyloid peptide found confirmation in the above-mentioned experimental data. This natural polyphenol blocks activation of the inflammatory factor of NF-κB transcription, suppressing phosphorylating and degradation of IκBα

(NF-κB inhibitor). Since the curcumin effect lies in inhibition of activation of IB kinase (IKK), required for NF-κB activation [85–87], just this fact may explain the detected anti-cytokine effect of curcumin in the investigated animals (Fig. 1–2).

The suppressive action of curcumin on ACE activity in hippocampus (by 3.7 times) and cerebral cortex (by 1.7 times) of the brain and absence of changes in the blood serum of the rats were shown (Table 2). The mechanism of curcumin effect on ACE activity is substantiated by suppressive influence of this polyphenol on the expression of the enzyme gene [88].

It is in the presence of such contrary effects that dualism of curcumin influence on the Alzheimer's disease experimental model in the rats lies.

REFEREENCES

1. *Shezad A., Lee Y. S.* Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors.* 2013, V. 39, P. 27–36.
2. *Aggarwal B. B., Kumar A., Bharti A. C.* Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003, V. 23, P. 363.
3. *Bharti A. C., Takada Y., Aggarwal B. B.* Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-κB ligand-induced NF-κB activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J. Immunol.* 2004, V. 172, P. 5940–5947.
4. *Teiten M. N., Dicato M., Diederich V.* Curcumin as a regulator of epigenetic events. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, V. 57, P. 1619–1629.
5. *Lee W. H., Loo C. Y., Bedawy M., Luk F., Mason R. S., Rohanizadeh R.* Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr. Neuropharmacol.* 2013, V. 11, P. 338–378.
6. *Jackson J. K., Higo T., Hunter W. L., Burt H. M.* The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm. Res.* 2006, 55 (4), 168–175.
7. *Banerjee M., Tripathi L. M., Srivastava V. M., Puri A., Shukla R.* Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2003, 25 (2), 213–224.
8. *Kunnumakkara A. B., Anand P., Aggarwal B. B.* Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* 2008, 269 (2), 199–225.
9. *Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M.* Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J. Neurosci. Res.* 2004, 75 (6), 742–750.
10. *Yang F., Lim G.P., Begum A.N., Ubeda O.J., Simmons M.R., Ambeqaokar S.S., Chen P.P., Kayed R., Glabe C.G., Frautschy S.A., Cole G.M.* Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (7), 5892–5901.
11. *Zhang L., Fiala M., Cashman J., Sayre J., Espinosa A., Mahanian M., Zaghi J., Badmaev V., Graves M. C., Bernard G., Rosenthal M.* Curcuminoids enhance amyloid-beta uptake by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimer Dis.* 2006, 10 (1), 1–7.
12. *Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J.* Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med. Princ. Pract.* 2015, V. 42, P. 1–10.
13. *Esparza T. J., Zhao H., Cirrito J. R., Cairns N. J., Bateman R. J., Holtzman D. M., Brody D. L.* Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* 2013, V. 73, P. 104–119.
14. *Palop J. J., Mucke L.* Amyloid-β-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 2010, V. 13, P. 812–818.
15. *Hardy J., Selkoe D. J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002, V. 297, P. 353–356.
16. *Grienberger C., Rochefort N. L., Adelsberger H., Henning H. A., Hill D. N., Reichwald J., Staufenbiel M., Konnerth A.* Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 2012, V. 774, P. 1–10.
17. *Nakajima C., Kulik A., Frotscher M., Herz J., Schäfer M., Bock H. H., May P.* LDL receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes. *J. Biol. Chem.* 2013, V. 30, P. 21909–21923.
18. *Selkoe D. J.* Soluble oligomers of the amyloid β-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* 2008, V. 192, P. 106–113.
19. *O'Brien R. J., Wong P. C.* Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 2011, V. 34, P. 185–204.

20. *Maltsev A. V., Dovidchenko N. V., Uteshev V. K., Sokolik V. V., Shtang O. M., Yakushin M. A., Sokolova N. M., Surin A. K., Galzitskaya O. V.* Intensive protein synthesis in neurons and phosphorylation of beta-amyloid precursor protein and tau-protein are triggering factors of neuronal amyloidosis and Alzheimer's disease. *Biomed. Chem.* 2013, V. 7, P. 278–293.
21. *Kim J-H., Anwyl R., Suh Y-H., Djamgoz M. B. A., Rowan M. J.* Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of β-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *J. Neurosci.* 2001, V. 21, P. 1327–1333.
22. *Hartmann T., Bieger S. C., Brühl B., Tienari P. J., Ida N., Allsop D., Roberts G. W., Masters C. L., Dotti C. G., Unsicker K., Beyreuther K.* Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease Abeta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 1997, V. 3, P. 1016–1020.
23. *Colombo A., Bastone A., Ploia C., Sclip A., Salmona M., Forloni G., Borsello T.* JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 2009, V. 33, P. 518–525.
24. *Andersen O. M., Reiche J., Schmidt V., Gotthardt M., Spoelgen R., Behlke J., von Arnim C. A. F., Breiderhoff T., Jansen P., Wu X., Bales K. R., Cappai R., Masters C. L., Glieman J., Mufson E. J., Hyman B. T., Paul S. M., Nykjær A., Willnow T. E.* Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, V. 102, P. 13461–13466.
25. *Ridge P. G., Ebbert M. T., Kauwe J. S.* Genetics of Alzheimer's disease. *Biomed. Res. Int.* 2013, V. 25, P. 49–54.
26. *Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F., Cole G.* Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996, V. 274, P. 99–102.
27. *Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N.* Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* 2002, V. 4, P. 1–22.
28. *Puzzo D., Privitera L., Fa' M., Staniszewski A., Hashimoto G., Aziz F., Sakurai M., Ribe E. M., Troy C. M., Mercken M., Jung S. S., Palmeri A., Arancio O.* Endogenous amyloid-β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* 2013, V. 69, P. 819–830.
29. *Kimura R., MacTavish D., Yang J., Westaway D., Jhamandas J. H.* Beta amyloid-induced depression of hippocampal long-term potentiation is mediated through the amylin receptor. *J. Neurosci.* 2012, V. 32, P. 17401–17406.
30. *Morley J. E., Farr S. A., Banks W. A., Johnson S. N., Yamada K. A., Xu L.* A physiological role for amyloid-β protein: enhancement of learning and memory. *J. Alzheimer's disease.* 2010, V. 19, P. 441–449.
31. *Cárdenas-Aguayo M. C., Silva-Lucero M. C., Cortes-Ortiz M., Jiménez-Ramos B., Gómez-Virgilio L., Ramírez-Rodríguez G., Vera-Arroyo E., Fiorentino-Pérez R., García U., Luna-Muñoz J., Meraz-Ríos M. A.* Physiological role of amyloid beta in neural cells: the cellular trophic activity. *INTECH*, 2014, 1–26.
32. *Cirrito J. R., May P. C., O'Dell M. A., Taylor J. W., Parsadanian M., Cramer J. W., Audia J. E., Nissen J. S., Bales K. R., Paul S. M., DeMattos R. B., Holtzman D. M.* In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J. Neurosci.* 2003, V. 23, P. 8844–8853.
33. *Puzzo D., Privitera L., Leznik E., Fa M., Staniszewski A., Palmeri A., Arancio O.* Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.* 2008, V. 28, P. 14537–14545.
34. *Atwood C. S., Obrenovich M. E., Liu T., Chan H., Perry G., Smith M. A., Martins R. N.* Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res. Rev.* 2003, V. 43, P. 1–16.
35. *Cetin F., Yazihan N., Dincer S., Akbulut G.* The effect of intrahippocampal beta-amyloid$_{1-42}$ peptide injection on oxidant and antioxidant status in rat brain. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007, V. 1100, P. 510–517.
36. *Curtain C. C., Ali F., Volitakis I., Cherny R. A., Norton R. S., Beyreuther K., Barrow C. J., Masters C. L., Bush A. I., Barnham K. J.* Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* 2001, V. 276, P. 20466–20473.
37. *Chen Y., Dong C.* Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 2009, V. 16, P. 386–394.
38. *Atwood C. S., Bishop G. M., Perry G., Smith M. A.* Amyloid-beta: a vascular sealant that protects against hemorrhage? *J. Neurosci. Res.* 2002, V. 70, P. 356.
39. *Soscia S. J., Kirby J. E., Washicosky K. J., Tucker S. M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M. A., Goldstein L. E., Duong S., Tanzi R. E., Moir R. D.* Bush, Ashley I., ed. The Alzheimer's disease-associated amyloid β-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE.* 2010, V. 5, P. e9505.
40. *Gu Z., Zhong P., Yan Z.* Activation of muscarinic receptors inhibits beta-

amyloidpeptide-induced signaling in cortical slices. *J. Biol. Chem.* 2003, V. 278, P. 17546–17556.
41. *Jellinger K. A.* Challenges in neuronal apoptosis. *Curr. Alzheimer Res.* 2006, V. 3, P. 377–391.
42. *Goure W. F., Krafft G. A., Jerecic J., Hefti F.* Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer's disease immunotherapeutics. *Alzheimers Res. Ther.* 2015, V. 6, P. 42.
43. *Sakono M., Zako T.* Amyloid oligomers: formation and toxicity of Aβ oligomers. *FEBS J.* 2010, V. 277, P. 1348–1358.
44. *Moreth J., Kroker K. S., Schwanzar D., Schnack C., von Arnim C. A. F., Hengerer B., Rosenbrock H., Kussmaul L.* Globular and protofibrillar Aβ aggregate simper neurotransmission by different mechanism. *Biochemistry.* 2013, V. 52, P. 1466–1476.
45. *Tamburri A., Dudilot A., Licea S., Bourgeois C., Boehm J.* NMDA-receptor activation but not ion flux is required for amyloid-beta induced synaptic depression. *PLoS One.* 2013, V. 8, P. e65350.
46. *Takamura A., Sato Y., Watabe D., Okamoto Y., Nakata T., Kawarabayashi T., Oddo S., Laferla F. M., Shoji M., Matsubara E.* Sortilin is required for toxicaction of Aβ oligomers (AβOs): extracellular AβOs trigger apoptosis,and intraneuronal AβOs impair degradation pathways. *Life Sci.* 2012, V. 91, P. 1177–1186.
47. *Slack B. E., Wurtman R. J.* Regulation of synthesis and metbolism of the amyloid precursor protein by extracellular signals. *Res. Progr. Alzheimer's Dis. Dement.* 2007, V. 2, P. 1–25.
48. *Mattson M. P.* Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004, V. 430, P. 631–639.
49. *Mehan S., Arora R., Sehgal V., Sharma D., Sharma G.* Inflammatory diseases — immunopathology, clinical and pharmacological bases; in Khatami M (ed): *Dementia: A Complete Literature Review on Various Mechanisms Involved in Pathogenesis and an Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease. Rijeka, InTech*, 2012, P. 3–19.
50. *Swardfager W., Lanctôt K., Rothenburg L., Wong A., Cappell J., Herrmann N.* A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry.* 2010, V. 68, P. 930–941.
51. *Minati L., Edginton T., Bruzzone M. G., Giaccone G.* Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am. J. Alzheim. Dis. & Other Dement.* 2009, V. 24, P. 95–121.
52. *Klafki H. W., Staufenbiel M., Kornhuber J., Wiltfang J.* Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain.* 2006, V. 129, P. 2840–2855
53. *Necula M., Kayed R., Milton S., Glabe C. G.* Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J. Biol. Chem.* 2007, V. 282, P. 10311–10324.
54. *Birks J.* Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006, CD005593.
55. *Gotti C., Riganti L., Vailati S., Clementi F.* Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 2006, V. 12, P. 407–428.
56. *Palmer G. C.* Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr. Drug. Targets.* 2001, V. 2, P. 241–271.
57. *Ostrowski S. M., Wilkinson B. L., Golde T. E., Landreth G.* Statins reduce amyloid-beta production through inhibitionof protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* 2007, V. 282, P. 26832–26844.
58. *Gray S. L., Anderson M. L., Crane P. K., Breitner J. C., McCormick W., Bowen J. D., Teri L., Larson E.* Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer'sdisease in older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2008, V. 56, P. 291–295.
59. *Dinarello C. A.* Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000, V. 118, P. 503–508.
60. *Hunter C.A., Timans J., Pisacane P., Menon S., Cai G., Walker W., Aste-Amezaga M., Chizzonite R., Bazan J. F., Kastelein R. A.* Comparison of the effects of interleukin-1α, interleukin-1β and interferon-γ inducing factor on the production of interferon-γ by natural killer. *Eur. J. Immunol.* 1997, V. 27, P. 2787–2792.
61. *Engelmann H., Novick D., Wallach D.* Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 1990, V. 265, P. 1531–1536.
62. *Dinarello C. A.* Anti-Cytokine Therapies in Response to Systemic Infection *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 2001, V. 6, P. 244–250.
63. *Huber T. S., Gaines G. S., Welborn M. B., Roseberg J. J., Seeger J. M., Moldawer L. L.* Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock.* 2000, V. 13, P. 425–434.
64. *Miners J. S., Baig S., Palmer J., Palmer L. E., Kehoe P. G., Love S.* Aβ-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2008, V. 18, P. 240–252.

65. *Iwata N., Higuchi M., Saido T. C.* Metabolism of amyloid-β peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* 2005, V. 108, P. 129–148.
66. *Erdös E. G.* Handbook of Experimental Pharmacology, 1979, 25 (S5), 438–487.
67. *Soffer R. L.* Biochemical Regulation of Blood Pressure (R. L. Soffer, ed.). *John Wiley & Sons, New York.* 1981, P. 123–164.
68. *Hu J., Igarashi A., Kamata M., Nakagawa H.* Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (51), 47863–47868.
69. *Kehoe P. G., Russ C., McIlroy S., Williams H., Holmans P., Holmes C.,Liolitsa D., Vahidassr D., Powell J., McGlennon B., Liddell M., Plomin R., Dynan K., Willimas N., Neal J., Cairns N. J., Wilcock G., Passmore P., Lovestone S., Williams J., Owen M. J.* Variation in DCP1, incoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer's disease. *Nat. Gen.* 1999, V. 21, P. 71–72.
70. *Hemming M. L., Selkoe D. J.* Amyloid β-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (45), 37644–37650.
71. *Vorobjova T. M.* Role of limbic andreticular systems in self stimulation. *Fed. Amer. Soc. Experim. Biol.* 1969, V. 70, P. 95–101.
72. *Bures J., Petran M., Zachar J.* Electrophysiological methods in biological research. *Ed., 2 Publishing House.* 1960, 516 p.
73. *Wang Y. J., Panand M. H., Chengetal A. L.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, V. 15, P. 1867–1876.
74. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, V. 193, P. 265–275.
75. *Ronca-Testoni S.* Direct spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme. *Clin. Chem.* 1983, V. 29, P. 1093–1096.
76. *Sokolik V. V., Maltsev A. V.* Cytokines neuroinflammatory reaction to β-amyloid 1-40 action in homoaggregatic and liposomal forms in rats. *Biomed. Chem.* 2015, 9 (4), 220–225.
77. *Dong Y-F., Kataoka K., Tokutomi Y., Nako H., Nakamura T., Toyama K., Sueta D., Koibuchi N., Yamamoto E., Ogawa H., Kim-Mitsuyama Sh.* Perindopril, a centrally active angiotensin-converting enzyme inhibitor, prevents cognitive impairment in mouse models of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2011, V. 25, P. 2911–2920.
78. *Arregui A., Perry E. K., Rossor M., Tomlinson B. E.* Angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease increased activity in caudate nucleus and cortical areas. *J. Neurochem.* 1982, V. 38, P. 1490–1492.
79. *Sadigh-Eteghad S., Sabermarouf B., Majdi A., Talebi M., Farhoudi M., Mahmoudi J.* Amyloid-Beta: A Crucial Factor in Alzheimer's Disease. *Med. Princ. Pract.* 2015, V. 24, P. 1–10.
80. *Ridolfi E., Barone C., Scarpini E., Galimberti D.* The role of the innate immune system in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration: an eye on microglia. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 939786.
81. *Boutajangout A., Wisniewski T.* The innate immune system in Alzheimer's disease. *Int. J. Cell. Biol.* 2013, 576383.
82. *Combs C. K., Karlo J. C., Kao S.-C., Landreth G. E.* β-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFα-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 2001, V. 21, P. 1179–1188.
83. *Smith J. A., Das A., Ray S. K., Banik N. L.* Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* 2012, V. 87, P. 10–20.
84. *Salminen A., Ojala J., Kauppinen A., Kaarniranta K., Suuronen T.* Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Progr. Neurobiol.* 2009, V. 87, P. 181–194.
85. *Aggarwal B. B., Gupta S. C., Sung B.* Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br. J. Pharmacol.* 2013, V. 169, P. 1672–1692.
86. *Jobin C. C., Bradham A., Russo M. P., Juma B., Narula A. S., Brenner D. A., Sartor R. B.* Curcumin blocks cytokine-mediated NF-κB activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor IB kinase activity. *J. Immunol.* 1999, V. 163, P. 34–74.
87. *Pan M. H., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K.* Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IB kinase and NF-κB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 2000, V. 60, P. 1665.
88. *Fazal Y., Fatima S. N., Shahid S. M., Mahboob T.* Effects of curcumin on angiotensin-converting enzyme gene expression, oxidative stress and anti-oxidant status in thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014, Epub 2014, pii: 1470320314545777.

BIOTECHNOLOGIA ACTA, V. 8, No 3, 2015

ВПЛИВ КУРКУМІНУ НА ВМІСТ ЦИТОКІНІВ І АНГІОТЕНЗИН-ПЕРЕТВОРЮВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ЗА ІНТРАГІПОКАМПАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ЩУРАМ β-АМІЛОЇДНОГО ПЕПТИДУ

В. В. Соколік[1]
С. М. Шульга[2]

[1]ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України», Харків
[2]ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Мета дослідження — вивчення впливу куркуміну на вміст цитокінів і ангіотензин-перетворювальну активність за умов інтрагіпокампального введення щурам β-амілоїдного пептиду. У тварин з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера застосовували назальну терапію водним розчином куркуміну. Реєстрували концентрацію цитокінів (інтерлейкіну-1β, інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-10, фактора некрозу пухлин α) і ангіотензинперетворювальну активність у відділах головного мозку (лобно-фронтальна кора і гіпокамп) та сироватці крові, а також показники умовно-рефлекторної реакції уникнення. За дії куркуміну встановлено зниження вмісту цитокінів на інтрагіпокампальне введення β-амілоїдного пептиду 42_Human і пригнічення ангіотензинперетворювальної активності в головному мозку, але не в сироватці крові. У результаті куркумінової терапії відзначено поліпшення когнітивних показників у щурів із хворобою Альцгеймера. Назальна терапія водним розчином куркуміну справляє антизапальний ефект у цільових відділах головного мозку (лобно-фронтальна кора і гіпокамп) та пригнічує ангіотензинперетворювальну активність.

Ключові слова: куркумін, β-амілоїдний пептид, цитокіни, ангіотензинперетворювальний ензим, хвороба Альцгеймера.

ВЛИЯНИЕ КУРКУМИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ИНТРАГИППОКАМПАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ β-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА

В. В. Соколик[1]
С. М. Шульга[2]

[1]ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков
[2]ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Цель исследования состояла в изучении влияния куркумина на содержание цитокинов и ангиотензинпревращающую активность в условиях интрагиппокампального введения крысам β-амилоидного пептида. У животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера применяли назальную терапию водным раствором куркумина. Регистрировали концентрацию цитокинов (интерлейкина-1β, интерлейкина-6, интерлейкина-10, фактора некроза опухоли α) и ангиотензинпревращающую активность в отделах головного мозга (лобно-фронтальная кора и гиппокамп) и сыворотке крови, а также показатели условно-рефлекторной реакции избегания. При действии куркумина установлено снижение содержания цитокинов на интрагиппокампальное введение Aβ42_Human и угнетение ангиотензинпревращающей активности в головном мозге, но не в сыворотке крови. В результате куркуминовой терапии отмечено улучшение когнитивных показателей у крыс с болезнью Альцгеймера. Назальная терапия водным раствором куркумина оказывает противовоспалительный эффект в целевых отделах головного мозга (лобно-фронтальная кора и гиппокамп) и угнетает ангиотензинпревращающую активность.

Ключевые слова: куркумин, β-амилоидный пептид, цитокины, ангиотензинпревращающий энзим, болезнь Альцгеймера.

Scholars International Journal of Biochemistry
Abbreviated key title: Sch. Int. J. Biochem.
A Publication by "Scholars Middle East Publishers"
Dubai, United Arab Emirates

ISSN: 2616-8650 (Print)
ISSN: 2617-3476 (Online)

Cytokine System Reactivity of the Rats' Brain at Intrabulbar Injection of β-Amyloid Aggregates

Sokolik VV[1], Berchenko OH[1], Levicheva NV[1], Shulga SM[2*]
[1]SE, Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of NAMN of Ukraine, Ukraine
[2]SE, Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAN of Ukraine, Ukraine

Original Research Article

***Corresponding author**
Shulga SM

Article History
Received: 22.09.2018
Accepted: 04.10.2018
Published: 30.10.2018

Abstract: Neuroinflammation, mediated by the reactivity of the system of cytokines, accompanies the flow of amyloidosis in Alzheimer's disease, alongside with disturbances in the work of central departments of the olfaction analyzer. Therefore, it is advisable to determine the reactivity of the cytokine system in the brain sections of elderly rats (neocortex, hippocampus, olfaction bulbs, hypothalamus, caudate nuclei) under the conditions of the bulbar effect of β-amyloid peptide aggregates. The content of tumor necrosis factor α, interleukin-6 and interleukin-10 in the brain sections of the rats having the age of 18 months (n = 24) that are being studied was determined 5 days after the intrabulbar injection of the suspension of β-amyloid peptide 40 (Amyloid β Protein Fragment 1-40, Sigma-Aldrich, USA) in the bidistilate or the solvent itself. It has been shown that the initial level of activity of the cytokine system (intact animals of the control group, n = 8) in the brain sections that are tangent to the olfaction analyzer (neocortex, hippocampus and olfactory bulbs) is probably lower in comparison to other parts (hypothalamus and caudate nucleus) of elderly rats. Intraubulbar injection of β-amyloid peptide 40 aggregates to elderly rats (experimental group, n = 8) increases the activity of the cytokine system in the brain structures distant from the spot of injection (neocortex and hippocampus) responsible for memory mechanisms. It has been determined that the reactivity of the cytokine system in the neocortex, hippocampus and hypothalamus is higher not only in response to the specific toxic effects of the β-amyloid peptide 40 aggregates (experimental group, n = 8), but also due to surgical intervention with the injection of solvent alone (comparison group, n = 8). It has been generalized that the low content of pro- and anti-inflammatory cytokines in phylogenetically younger parts of the brain (neocortex, hippocampus) of intact animals corresponded to increased reactivity of the cytokine system under the influence of exogenous β-amyloid peptide 40.

Keywords: β-amyloid peptide, cytokines, Alzheimer's disease, rat, neuroinflammation, neocortex, hippocampus, olfactory bulb.

INTRODUCTION

At present, evidence is provided that the β-amyloid peptide (Aβ) aggregates are ordered oligomers and the causes, rather than amyloidogenic pathology outcome, in particular - Alzheimer's disease (AD) [1, 2]. For the first time, the description of AD was made by Alois Alzheimer in 1907, although other doctors also made similar and quite complete assessments of neuropathological events occurring in the brain with AD [3-5]. It has been shown that neuroinflammation is one of the early biomarkers of AD leading to increased neurodegenerative pathology and amyloidosis [6-8]. Aβ-oligomers interact with microglial and astrocytic pattern recognition receptors that activate the innate immunity. The process involves the secretion of cytokines, chemokines, and the formation of active forms of oxygen, the surplus of which leads to a dysregulated immune response that promotes neurodegeneration. The mechanisms with the help of which a neuroinflammatory reaction can affect the formation of Aβ and its aggregation become key, the therapeutic intervention may slow the progression of AD [9]. Nevertheless, the reactivity of the congenital (peptide) immunity, in particular the system of cytokines, may have its specificity in different sections of the brain according to the age norm and under the toxic effect of Aβ oligomers.

It is known that another early biological marker of AD is anosmia (loss of olfaction) [10-12], which is associated with a violation of central mechanisms for processing olfactory information, namely in olfactory bulbs and periformal cerebral cortex. It should be noted that olfactory centers have

Copyright @ 2018: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium for non commercial use (NonCommercial, or CC-BY-NC) provided the original author and source are credited.

numerous connections with the hippocampus, the limbic system and the individual nuclei of medulla oblongated marrow nerves. Therefore, it has been advisable to determine the cytokine response in the brain parts of animals involved in the olfactory analyzer (neocortex, hippocampus, olfactory bulbs) in comparison with other (hypothalamus, caudate nuclei) in the localization of Aβ aggregates in the olfactory bulb.

The purpose of the study was to determine the reactivity of the cytokines system in the brain parts of rats under the conditions of the bulbar effect of the β-amyloid peptide aggregates.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed on 24 elderly male rats (18 months age) weighing 450-520 g. All the animals were staying under the controlled 12-hour light-dark cycle and standard feeding for rodents and tap water. Experimental protocols were conducted in accordance with the General Ethical Principles of Animal Experiments [25], the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used in experiments and other scientific purposes [26], internationally recognized principles for the use and care of laboratory animals, as specified in United States guidelines [13].

The rats were randomly assigned to 3 groups. Control group (n = 8) included intact animals. Experimental group (n = 8) - rats being 5 days after the injection of a suspension of $A\beta_{40}$ aggregates into the olfactory bulb (experimental model of AD); Comparison group (n = 8) - rats being 5 days after the injection of the solvent (H_2O) into the olfactory bulb. The volume of the solutions was 10 μl per animal, the speed of injection through the needle of the chromatographic syringe was 0.03 μl/sec, and the injection duration equaled 5 minutes. Stereotaxic operations were performed under general anesthesia of rats using intraperitoneal injections of thiopental, 50 mg/kg per body weight. A solution of the β-amyloid peptide 40 (Amyloid β Protein Fragment 1-40, Sigma-Aldrich, USA) in the bidistillate was aggregated for 24 hours at 37°C. Large $A\beta_{40}$ conglomerates were dispersed with the help of ultrasound and sterilized immediately before the injection. The stereotactic coordinates of the area of the left olfactory bulb were determined based on the brain card of Ya.Buresh [14], which corresponds to the distance from the intersection point of the sagittal suture with the bregma (zero point): distally (-6) mm, laterally - 0.5 mm and to the deep - 2.5 mm. The animals were decapitated. In the cold, neocortex, hippocampus, hypothalamus, olfactory bulbs and caudate nuclei were isolated, the latter were frozen and stored prior to the ELISA analysis of cytokines at -40°C. The tissues of the brain sections being studied were homogenized in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes, then they collected a supernatant. Samples of supernatants of the above-mentioned brain sections of rats were used in order to determine cytokines according to the instructions of the Rat ELISA Kits Invitrogen BCM DIAGNOSTICS, USA tumor necrosis factor-α (TNFα), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL- 10). OD was read by a microplate analyzer GBG Stat FAX 2100 (USA) at 450 nm with a wavelength correction at 630 nm. Data of ELISA (μg/l) were counted in view of the total protein in grams. The figure shows the data presented as a percentage of the performance of Control group intact animals. The total protein content was determined by Lowry's method [15]. The obtained results were processed statistically, mean values and standard deviations were calculated. Statistical analysis of the differences was performed using Student's *t*-test, values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Table-1 shows the data on the baseline cytokine content (TNFα, IL-6 and IL-10) in the studied rat brain sections (Control group intact animals). The probable lower overall level of both pro- (TNFα, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines catches the eye as regards the neocortex, hippocampus and olfactory bulbs in comparison to the hypothalamus and caudate nuclei of the rat brain, with the exception of IL-6 in the hippocampus and olfactory bulbs. Such unexpected at first glance results contradict the information that with coming of age, the new brain cortex and hippocampus suffer from excessive activity of the cytokine system, even without amyloidosis due to the forced hyperactivity of their neurons [16-17]. That is, according to our data, the initial level of activity of the cytokine system in the rat brain sections that are relevant to the olfactory analyzer (neocortex, hippocampus and olfactory bulbs) is probably lower in comparison to other parts (hypothalamus and caudate nuclei). Why then is exactly the olfaction primarily affected by age-related amyloidosis, and only then cognitive deficits, depression and dementia are involved?

Figure-1 presents the results regarding the reactivity of the cytokine system in response to the toxic effect of exogenous $A\beta_{40}$ aggregates in 5 days after their intrabulbic injection. Diagram A gives data on the overall effect of $A\beta_{40}$ as a percentage of the initial level (Table-1), in Diagram B - non-specific solvent effect (H_2O) alongside with surgical intervention. The injection of the $A\beta_{40}$ aggregates induced a significant increase in the cytokine system in almost all of the studied brain sections of rats in the Experimental group: the content of TNFα, IL-6 and IL-10 increased in comparison to intact animals primarily

in the direct administration line, olfactory bulbs, as well as in hippocampus; proinflammatory TNFα and IL-6 in neocortex and hypothalamus and TNFα in caudate nuclei. Instead, the effect of intrabulbic injection of the solvent itself (alongside with surgical intervention) in the Comparison group affected the probable increase in the concentration of all three cytokines only in hippocampus; TNFα and IL-6 in neocortex and hypothalamus and TNFα in olfactory bulbs and caudate nuclei.

The specificity of the pro-inflammatory effects of $A\beta_{40}$ aggregates is evidenced by the data of Diagram C, which shows cytokine response in the studied brain sections of rats, with the exception of the consequences of surgical intervention (with intrabulbic injection of solvent - bidistilled water). Consequently, unlike the cerebral or hypocampal effects of the β-amyloid peptide aggregates [18, 19], the most specific $A\beta_{40}$-induced inflammation was not detected in the injection line of $A\beta_{40}$-aggregates - olfactory bulbs. A specific increase in the level of proinflammatory cytokines (TNFα, IL-6) and the absence of changes in the concentration of anti-inflammatory IL-10 was observed in neocortex, hippocampus and hypothalamus. Transsynaptic disturbances and activation of astroglia and microglia in remote locations of $A\beta_{25\text{-}35}$ were also detected in the administration of the oligopeptide in the almond-like complex or the hippocampus [20-21], the loss of neurons and the presence of diffuse deposits of amyloid in neocortex under intravenous cerebrovascular injection of $A\beta_{25\text{-}35}$ to the ventricles the brain [22]. However, as our study in caudate nuclei showed, there were not any specific changes of the cytokine activity in response to the bulbar effect of the $A\beta_{40}$ aggregates.

It is necessary to generalize that in neocortex, hippocampus and hypothalamus, the reactivity of the cytokine system was the greatest not only due to the specific toxic effect of $A\beta_{40}$ aggregates (Fig-C), but also due to surgical intervention (Fig-B). That is, the generally low content of pro- and anti-inflammatory cytokines in these brain sections is offset by the increased reactivity of the cytokine system. Olfactory bulbs have displayed low levels of cytokines in intact animals and a low degree of their activation under the influence of exogenous aggregates of the β-amyloid peptide. This gives the opportunity to assume: neuroinflammation damage to the olfactory analyzer in amyloidosis primarily concerns high-reactivity and new brain sections – neocortex and hippocampus, but not olfactory bulbs. Nevertheless, our data show that olfactory bulbs play a startup role in the spread of neuroinflammation in brain structures, which are responsible for cognitive abilities (neocortex and hippocampus), which can serve as a mechanism of memory damage. In general, it should be noted about essential and vital deeper neuronal bonds existing between olfactory bulbs and neocortex and hippocampus. The Data of Almeida R. F. and other collaborators show an increase in levels of proinflammatory cytokines (IL-1, TNFα, IL-6) and depletion of IL-10 in hippocampus, which weakly correlated with the degree of neuroinflammatory process in neocortex, in mice with bilateral bilobectomy olfactories [23]. Some authors have demonstrated by a similar model of AD that olfactory bulbs protect the neurons of neocortex and hippocampus from toxic aggregates of β-amyloid peptides at the morphological level and prevent memory loss [24].

Thus, the specific reactivity of the cytokine system of the brain sections of rats discovered while examining highlights the functional mechanisms of their interaction.

Competing interests

Authors have declared that no competing interests exist.

Table-1: Comparative analysis of the content of cytokines in the brain sections of intact rats

Brain sections Cytokine	Neocortex	Hippocampus	Olfactory bulb	Hypothalamus	Caudate nucleus
TNF α (ng/g protein)	$56.5\pm3.2^{a,b}$	$74.9\pm5.9^{a,b}$	$66.3\pm6.5^{a,b}$	94.0 ± 11.4	110.5 ± 15.9
Interleukin-6 (ng/g protein)	$51.7\pm3.8^{a,b}$	67.0 ± 5.7	62.2 ± 5.7^{a}	76.6 ± 8.6	74.7 ± 6.7
Interleukin-10 (ng/g protein)	$181.3\pm26.8^{a,b}$	$200.9\pm13.5^{a,b}$	$178.9\pm13.5^{a,b}$	259.7 ± 20.2	241.3 ± 17.8
Values are expressed as mean ± SEM (n= 8 rats/ group), ^{a} – $p \leq 0.05$ when compared with the indicators of cytokines in the hypothalamus; ^{b} – $p \leq 0.05$ when compared with those in the caudate nucleus					

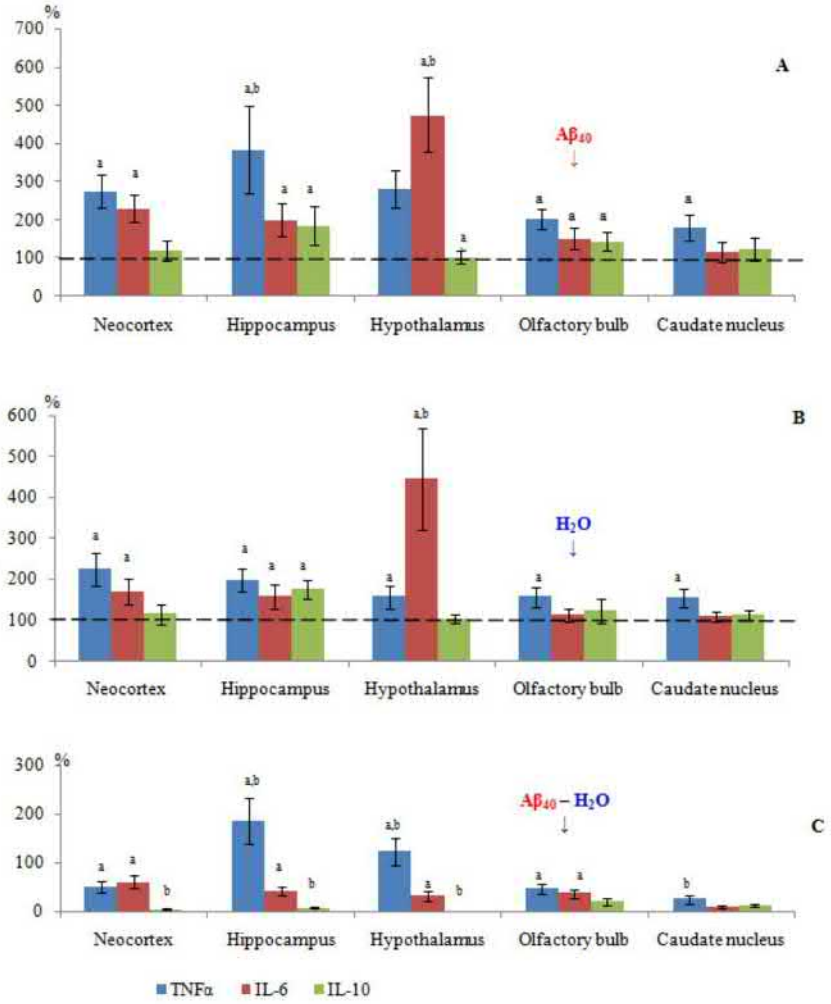


Fig-1: Reactivity of the system of cytokines in the brain sections of male rats 18 months of age 5 days after the intrabulbular administration of the $A\beta_{40}$ aggregates (A); H_2O (B) and the specific anti-inflammatory effect of $A\beta_{40}$, as the difference between these two factors (C).

Data are presented as a percentage of baseline intact animals (Table-1). [a] – $p \leq 0.05$ when compared with the corresponding indicators of the reactivity of the system of cytokines in intact animals (100 %); [b] – $p \leq 0.05$ when compared with the indicators of reactivity of the system of cytokines in olfactory bulbs

CONCLUSIONS

- The initial level of the activity of the cytokine system in the brain sections that are relevant to the olfactory analyzer (neocortex, hippocampus and olfactory bulbs) of elderly rats is significantly lower in comparison to other sections (hypothalamus and caudate nuclei).
- Intrabulbar injection of $A\beta_{40}$ to elderly rats increases the activity of the cytokine system in the brain structures remote from the injection spot (neocortex and hippocampus) relevant to the memory mechanisms.
- The reactivity of the cytokine system in neocortex, hippocampus and hypothalamus is higher not only in response to the specific toxic effect of $A\beta_{40}$ aggregates, but also under the conditions of surgical intervention with a bulbar injection of solvent alone.
- The generally low content of pro- and anti-inflammatory cytokines in the phylogenetically younger brain sections (neocortex, hippocampus) was consistent with the increased reactivity of the cytokine system under the influence of the exogenous β-amyloid peptide 40.

REFERENCES

1. Esparza, T. J., Wildburger, N. C., Jiang, H., Gangolli, M., Cairns, N. J., Bateman, R. J., & Brody, D. L. (2016). Soluble amyloid-beta aggregates from human Alzheimer's disease brains. *Scientific reports*, *6*, 38187.
2. Rijal Upadhaya, A., Kosterin, I., Kumar, S., von Arnim, C. A., Yamaguchi, H., Fändrich, M., ... & Thal, D. R. (2014). Biochemical stages of amyloid-β peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain*, *137*(3), 887-903.
3. Allgemeine Zeitschrift honey Psyciatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin. (1907). 64, 3.
4. Fischer. (1907). Monatsschr Psychiat Neurol, 22, 17.
5. Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure?. *Journal of neurochemistry*, *139*, 237-252.
6. Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, *136*(3), 457-474.
7. Domingues, C., da Cruz E., Silva, O. A. B., & Henriques A. G. (2017). Impact of cytokines and chemokines on Alzheimer's disease neuropathological hallmarks. *Curr Alzheimer Res*, *14*(8), 870-882.
8. Sokolik, V. V., Karpov, P. V., & Samofalova, D. A. (2016). Anti-cytokine activity of curcumin and its binding to a fragment of AβPP. *Advances in Biochemistry*, *4*(4), 34-46.
9. Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2015). Three dimensions of the Amyloid hypothesis: time, space, and wingmen. *Nature Neuroscience*, *18*(6), 800-806.
10. Vasavada, M. M., Martinez, B., Wang, J., Eslinger, P. J., Gill, D. J., Sun, X., ... & Yang, Q. X. (2017). Central olfactory dysfunction in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a functional MRI study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *59*(1), 359-368.
11. Azo-Minguez, A., & Zetterberg, H. (2014). Pathways to Alzheimer's disease. *Journal of internal medicine*, *275*(3), 296-303.
12. Roberts, R. O., Christianson, T. J., Kremers, W. K., Mielke, M. M., Machulda, M. M., Vassilaki, M., ... & Petersen, R. C. (2016). Association between olfactory dysfunction and amnestic mild cognitive impairment and Alzheimer disease dementia. *JAMA neurology*, *73*(1), 93-101.
13. US Environmental Protection Agency. (2012). Health effects test guidelines OPPTS 870.100. Washington: US EPA.
14. Bures, J., Petran, M., & Zachar, J. (1960). Electrophysiological methods in biological research. Ed.2 Publishing House. 516.
15. Lowry, O. H., Rosebrough N. J., & Farr, A. L. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
16. Sparkman, N. L., & Johnson, R. W. (2008). Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*, *15*(4-6), 323-330.
17. Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M. M., & Acarin L. (2009). Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(11), 2484-2497.
18. Sokolik, V. V., & Maltsev, A. V. (2015). Cytokines neuroinflammatory reaction to β-amyloid 1-40 action in homoaggregatic and liposomal forms in rats. *Biochem* (Mosc) *Suppl Ser B: Biomedical chemistry*, *9*(4), 355-361.
19. Sokolik, V. V., & Shulga, S. M. (2015). Influence of curcumin on cytokines content and angiotensin-converting activity under intrahippocampus administration of β-amyloid peptide in rats. *Biotechnologia Acta*, *8*(3), 78-88.
20. Sigurdsson, E. M., Lorens, S. A., & Hejna, M. J. (1996). Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-beta 25–35 injections into the amygdala of young F344 rats. *Neurobiol Aging*, *17* (6), 893-901.
21. Stepanichev, M. Y., Ivanov, A. D., & Lazareva, N. A. (2016). Neurodegenerative changes induced by injection of ß-amyloid peptide fragment (25-35) in hippocampus are associated with NGF-signalling activation. *Vestnik RGMU*, 1, 14-19.
22. Maurice, T., Lockhart, B. P., & Privat, A. (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*, *706*(2), 181-193.
23. Almeida, R. F., Ganzella, M., & Machado, D. G. (2017). Quincozes-Santos A, Pettenuzzo LF, Duarte MMMF, Duarte T, Souza DO. Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 76, 1-11.
24. Volpina, O. M., Samokhin, A., & Koroev, D. (2018). Synthetic fragment of receptor for advanced glycation end products prevents memory loss and protects brain neurons in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61: 1061-1076.

(11) **129295**

(19) **UA**

(51) **МПК**
G09B 23/28 **(2006.01)**
A61K 31/05 **(2006.01)**
A61P 25/28 (2006.01)

(21) Номер заявки: **u 2018 04802**

(22) Дата подання заявки: **02.05.2018**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.10.2018**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **25.10.2018, Бюл. № 20**

(72) Винахідники:
Соколік Вікторія Василівна, UA,
Берченко Ольга Григорівна, UA,
Левічева Наталія Олександрівна, UA,
Шульга Сергій Михайлович, UA

(73) Власник:
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕВРОЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА НАРКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",
вул. Академіка Павлова, 46, м. Харків, 61068, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ НЕЙРОЗАПАЛЕННЯ ТА КОРЕКЦІЇ ПАМ'ЯТІ ПРИ ХВОРОБІ АЛЬЦГЕЙМЕРА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Формула корисної моделі:

1. Спосіб пригнічення нейрозапалення та корекції пам'яті при хворобі Альцгеймера в експерименті, що включає введення поліфенольної сполуки в мозок тваринам (лабораторним щурам), який відрізняється тим, що як поліфенол використовують куркумін.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що поліфенол куркумін вводять у мозок інтраназально у формі ліпосом один раз на добу дозою $12,0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Корисна модель належить до медицини, а саме: неврології та психіатрії, та може бути використана для пригнічення нейрозапалення та покращення процесів пам'яті при дегенеративній патології мозку.

Прототипом корисної моделі є спосіб покращення когнітивної функції мозку, в якому шляхом введення непептидних поліфенольних сполук у боковий шлуночок головного мозку, забезпечується запобігання агрегації β-амілоїдних пептидів з утворенням нейротоксичних протеїнів ADDL, що призводить до покращення пам'яті, мислення, когнітивних здібностей. Недоліком прототипу корисної моделі є його суттєва травматичність, а саме те, що непептидні поліфенольні сполуки необхідно вводити через канюлю у боковий шлуночок головного мозку щурам з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера (пат. RU 2461377. Способ улучшения когнитивной функции /Гауэр Уильям Ф. (US), Краффт Грант А. (US), Прэй Годди (US), № заявки 2010104038/15, опубліковано 20.09.2012 Бюл. № 26).

В основу корисної моделі поставлена задача підвищити біодоступність поліфенольних сполук для клітин головного мозку, використовуючи куркумін у формі ліпосом, які запобігають прискореному метаболізму і елімінації цього поліфенолу при інтраназальному введенні, минаючи гематоенцефалічний бар'єр, що є цілком безпечно та покращує його активний транспорт у передні відділи головного мозку з метою пригнічення нейрозапалення.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі пригнічення нейрозапалення та корекції пам'яті при хворобі Альцгеймера в експерименті, що включає введення поліфенольної сполуки в мозок тваринам (лабораторним щурам), як поліфенолу використовується куркумін, який вводиться у мозок інтраназально, у формі ліпосом один раз на добу дозою $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Спосіб здійснюється в наступному порядку.

У інтактних тварин (лабораторні щури) виробляють умовно-рефлекторну реакцію уникання на пред'явлення як умовного сигналу звуку метроному 300 уд/хв, а безумовного підкріплення - електрошкірне больове подразнення напругою до 30 В. У цих тварин моделюють хворобу Альцгеймера стереотаксичним введенням 10 мкл агрегатів β-амілоїдного пептиду Aβ42_Human в гіпокамп в дозі 200 мкг/кг маси тіла щура. Через 7 діб після введення агрегатів Aβ42_Human починають назальну терапію ліпосомною формою куркуміну: інтраназальне введення цього поліфенолу у ліпосомах здійснюють один раз на добу дозою $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Пам'ять щурів оцінюють за якісно-кількісними показниками умовних рефлексів уникання тричі: до і на 7 добу після інтрагіпокампального введення агрегатів Aβ42_Human та після інтраназального введення ліпосомного куркуміну.

У гіпокампі та неокортексі імуноферментним методом визначають рівні інтерлейкінів (IL-6, IL-10) і фактора некрозу пухлини альфа (TNFα) в групі контролю (інтактні щури), в групі модель хвороби Альцгеймера (через 7 діб після введення агрегатів Aβ42_ Human)ів групі лікування (через 30 діб назальної терапії ліпосомним куркуміном).

Таким чином, інтраназальне введення природного поліфенолу куркуміну у формі ліпосом сприяє його активному транспорту у передні відділи головного мозку, викликає пригнічення нейрозапалення у структурах мозку, які відповідають за реалізацію пам'яті.

Приклад.

У щура з виробленою умовно-рефлекторною реакцією уникання латентні періоди реакції уникання складали 5,2 с, число позитивних умовно-рефлекторних відповідей на пред'явлення умовного сигналу - 100 %, що оцінювали як прояв стійкої умовно-рефлекторної реакції уникання.

Введення у гіпокампу агрегатів Aβ42_Human через 7 діб призводило до погіршення пам'яті щура: зниження на 30 % частки умовно-рефлекторних відповідей на пред'явлення умовно-рефлекторного сигналу, що складало 70 % проти 100 % показників, які визначалися до введення агрегатів Aβ42_Human, та підвищення латентного періоду реалізації умовних рефлексів до 7,2 с проти 5,2 с, що спостерігалося до введення агрегатів β-амілоїдного пептиду.

В той же час відзначалася активація цитокінової ланки нейрозапалення. Рівень прозапальних цитокінів у гіпокампі складав: TNFα-63,8 проти 50,7 нг/г білка в контролі; IL-6 - 72,8 проти 57,3 нг/г білка відповідно. Рівень протизапального цитокіну IL-10 - 254,3 проти 130,4 нг/г білка у контролі. В неокортексі рівень прозапальних цитокінів складав: TNFα - 46,2 проти 50,8 нг/г білка в контролі; IL-6 - 80,8 проти 52,5 нг/г білка відповідно. Рівень IL-10 - 150,8 проти 179,5 нг/г білка відповідно.

Після інтраназального введення поліфенолу куркуміну у формі ліпосом дозою $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси щура раз на добу протягом 30-ти діб виявлено наступне:

1. Покращення кількісно-якісних показників умовно-рефлекторної діяльності, що проявлялося у скороченні латентного періоду умовно-рефлекторних реакцій уникання до 6,2 с проти 7,2 с після введення агрегатів β-амілоїдного пептиду 42 та у збільшенні частки вірних відповідей до 78 % проти 70 % відповідно.

2. Рівень прозапальних цитокінів у гіпокампі знизився: TNFα - до 28,3 проти 63,8 нг/г білка після введення агрегатів β-амілоїдних пептидів 42; IL-6 - до 44,7 проти 72,8 нг/г білка, а рівень протизапального IL-10 - до 122,4 проти 254,3 нг/г білка відповідно.

3. В неокортексі виявлено зниження TNF-α до13,2 проти 46,2 нг/г білка у щурів після введення агрегатів (3-амілоїдних пептидів 42; 1L-6 - до 26,8 проти 80,8 нг/г білка відповідно, IL-10 - 89,4 проти 150,8 нг/г білка, що свідчить про специфічне пригнічення поліфенолом куркуміном цитокінової ланки нейрозапалення у структурах мозку: гіпокампі та неокортексі, які відповідають за реалізацію процесів пам'яті.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб пригнічення нейрозапалення та корекції пам'яті при хворобі Альцгеймера в експерименті, що включає введення поліфенольної сполуки в мозок тваринам (лабораторним щурам), який **відрізняється** тим, що як поліфенол використовують куркумін.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що поліфенол куркумін вводять у мозок інтраназально у формі ліпосом один раз на добу дозою $12{,}0\times10^{-6}$ г/кг маси щура протягом 30-ти діб.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

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

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

також маргаринів для листкового тіста. При цьому кількість SFL, яка потрібна для створення стійкої емульсії, в два рази менше (0,05%), ніж за використання лецитину сої (SL) (0,125%), а для стабільних емульсій майонезу зменшення кількості жиру досягає 1,5–2 рази.

«БІОЛЕР» ТОВ
Науково-Виробниче Підприємство

ХАРЧОВІ, КОРМОВІ, ФАРМ. ФОСФОЛІПІДИ. ТЕХНОЛОГІЇ ФОСФОЛИПІДІВ З РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

СЕРТИФІКАТ ЯКОСТІ

Знежирений лецитин з соняшника порошкоподібний
ТУУ 21.1-38873237-001:2013

Партія № 15102012 Дата виробництва: грудень / 2020 р.

Найменування показників згідно ТУУ 21.1-38873237-001:2013	Характеристика та норма	Результати
Зовнішній вигляд	Сипуча порошкоподібна маса без сторонніх включень	відповідає
Запах та смак	Без смаку та запаху. Допускається ледь помітний специфічний присмак і запах соняшникової олії. Не допускається затхлий, кислий чи інші сторонні смак і запах.	відповідає
Колір	Від жовтувато-сірого до жовтувато-коричневого.	відповідає
Масова частка вологи, %, не більше	1.4	0,3
Масова частка олії, %, не більше	1,5	0,7
Перекисне число, ммоль/кг ½O_2, не більше	10.0	2,1
Кислотне число, мг КОН/г, не більше	32.0	16,0
Масова частка речовин, нерозчинних у толуолі, %, не більше	2.0	0,1
Масова частка фосфоліпідів, %, не менше	95.1	98.9
pH 1% водного розчину	6-7	6,4
Вміст токсичних елементів, мг/кг, не більше: свинець кадмій миш'як ртуть афлатоксин В1	 1.0 0.05 1.0 0.02 0.005	 < 0.1 <0.01 < 0.0025 < 0.00015 < 0.001
Мікробіологічні показники Бактерії групи кишкових паличок Коліформи у 0,01г Патогенні мікроорганізми, у т.ч. бактерії роду Сальмонела у 25г Дріжджі, КУО/г Плісняві гриби, КУО/г	 Не допускається Не допускається <100 < 100	 відсутні відсутні <10 <10
Кількть мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікр.орг-ів, КУО/г B.cereus, КУО/г	< 5000 < 50	< 10 < 10
Радіонукліди, Вк/кг, не більше: ^{137}Cs ^{90}Sr	150 50	2.4 0.6
Вміст Пестицидів		
Тирам, мг/кг	Не допускається	Не виявлено (<0,05*)
Гептахлор, мг/кг	Не допускається	Не виявлено (<0,05*)
Дилдрин, мг/кг	Не допускається	Не виявлено (<0,05*)
ДДТ, мг/кг	0,1	Не виявлено (<0,006*)
ДДЕ, ДДД (метаболіти ДДТ), мг/кг	0,1	Не виявлено (<0,004*)
γ-ГХЦГ, мг/кг	0,1	Не виявлено (<0,002*)
Паратіон-метил, мг/кг	Не допускається	Не виявлено (<0,02*)
Залишковий вміст ацетону, мг/кг	< 50	5,0

* - нижче чутливості методу

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

Гарантійний термін зберігання не менше 24 місяців від дати виробництва за умови зберігання в оригінальній упаковці у прохолодному та сухому місці.

Директор О.В.Тимошенко

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

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

Рис 1. Сертифікат якості знежиреного лецитину соняшника.

Макрокомпонентний склад сухого знежиреного лецитину визначено в порівнянні з результатами дослідження ВЕРХ стандартної (відомий склад і концентрація компонентів) суміші фосфоліпідів сої. Серед основних макрокомпонентів SFL визначено фосфатидилхолін (PC); фосфатидилетаноламін (PE); фосфатидилінозитол (PI); фосфатидна кислота, phosphatidic acid (PA); хлорагенова кислота, chlorogenic acid (ChA); α-токоферол (α ToC) (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст фосфоліпідів в різних зразках

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

Ідентифікацію фосфоліпідів та їх жирнокислотний склад проводили методом тандемної мас-спектрометрії. Використовували електрохімічне розпилення в позитивному (ідентифікація фосфатидилхолінів) та негативному (інших фосфоліпідів) режимах. За допомогою даного спектру за масами молекулярних іонів було ідентифіковано PI, PE, PA і фосфогліцерол (PG) та їх відповідні лізоформи. Спектр мас іонів PC, який не видно в негативній, проводили в позитивній іонізації. Маса його основних молекулярних йонів складала 782,7 та

784,7. Молекулярна маса залишку холіну складала 520,4, що підтверджує, що це саме форми фосфатидилхоліну (табл. 2).

Таблиця 2

Результати ідентифікації компонентів лецитину соняшника

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

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

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

Моделювання стабільності ліпосом («крупнозерниста» модель) для з'ясування деформації форми різних видів ліпосом. Досліджували два типи моделей: 1) моделі з однаковим числом (SNL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів, розташованих на внутрішньому і зовнішньому шарах мембрани

ліпосом і 2) модель з однаковою щільностю (SDL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів у внутрішньому та зовнішньому шарах ліпосоми. Ліпосоми в процесі експериментів реально мали коливання щільності в межах між SNL та SDL. Щільність PHO на внутрішній поверхні приймалась за початкову умову. У ліпосомах SDL типу, внутрішній і зовнішній шари ліпосом були незалежно побудовані з одиничних правильно орієнтованих молекул фосфоліпідів. Для моделювання обрали наступні фосфоліпіди: dipalmitoyl-phosphatidyl-choline, (DPPC); dimyristoylglycero-phosphatidyl-choline, (DMPC); palmitoyloleoyl-phosphatidyl-choline, (POPC); palmitoyloleoyl-phosphatidyl-ethanolamine (POPE).

Мономери фосфоліпідів було рівномірно розташовано на обох поверхнях таким чином, щоб щільність фосфоліпідів в обох шарах була однакова, а “хвости” жирних кислот було направлено на зустріч один одному. У невеликих за розміром ліпосомах, ділянки внутрішньої та зовнішньої поверхні суттєво інші. Внутрішню порожнину ліпосоми заповнювали молекулами води, які мали таку ж щільність що і назовні і мали початкову структуру сольватованої ліпосоми. Для чотирьох типів SNL, кожен з яких складався з 3278 ліпідів, було встановлено діаметр і товщина мембрани – 25 і 4,5 нм, відповідно. Порівняно з SNL, зовнішній шар SDL заповнений більшою кількістю ліпідів і тому він більш щільно вкритий полярними групами.Моделювання з використанням молекулярної динаміки (MD) показало, що: 1) SNL зберігали сферичну форму навіть за 360 K, що свідчило про їх більшу стійкість до теплових коливання в порівнянні з SDL, 2) SNL, що складались з DMPC, мали сферичну форму, мінімальний діаметр, навіть за 360 K. 3) SDL мали практично ідеальну геометричну форму, оскільки їх зовнішня поверхня рівномірно заповнена полярними групами ліпідів за 310 K. Однак, за 360 K у SDL відбуваються значні деформаційні зміни сферичної форми.

Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. За активації м’язової діяльності гідроліз ATP пришвидшується й інтенсивність енергетичного обміну зростає в сотні разів порівняно зі станом спокою. Як спосіб захисту ATP від руйнування за перорального застосування було досліджено ліпосомальні форми ATP. Вплив

ліпосомальної форми АТР на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження. Експериментальних тварин поміщали в резервуар діаметром 1,5 м, завглибшки 0,8 м, заповнений водою з температурою 28–32 °С. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомної форми АТФ оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з контрольними групами, які отримували АТР у вільному вигляді. Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах від 30 до 1 000 нм, хоча розміри переважної більшості ліпосом (W за кількістю = 91%) — в діапазоні від 30 до 100 нм. і лише незначна кількість фосфоліпідних структур (W за кількістю = 9%) мали розміри, що перевищують 100 нм. Результати дослідження функціональної ефективності ліпосомальної форми АТР наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Дослідження функціональної ефективності ліпосомальної форми АТР

День експери менту	1група*	2 група	3 група	4 група	5 група	6 група
	Тривалість плавання, с					
6-й	138.4±5.5	142.5±3.5	144.5±2.7	149.9±4.6	234.8±5.11	264.3±7.1
12-й	138.9±6.5	144.5±3.7	145.2±3.9	148.3±5.1	237.6±4.7	286.3±9.4

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

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

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

83,49 ± 3,52%., а для екструзії через мембрани 95,34 ± 3,76%.

Специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних гексамерах. Патогенез хвороби Альцгеймера (AD) супроводжується виникненням старечих бляшок, що складаються з бета-амілоїдних-пептидів (Aβ). Aβ має декілька гідрофобних амінокислотних залишків і, завдяки гідрофобній взаємодії між ними, Aβ можуть утворювати стабільні агрегати у воді, що призводить до утворення Aβ фібрил. Зокрема, міжмолекулярна взаємодія в двох β –листових ділянках сусідніх Aβ сприяє стабілізації агрегатів Aβ. Отже, речовини з сильною спорідненістю до β –листових ділянок, можуть інгібітувати агрегацію Aβ і бути інгібітором патогенезу AD. Для розрахунків вибрали структурну модель (PDB ID: 2M4J) для Aβ фібрили *in vivo*, яка була отримана за допомогою твердотільного ЯМР (ssNMR) та EPR і мала специфічну для структури тривимірну симетрію щодо осі росту фібрил. Було побудовано 20 моделей Aβ гексамера і оптимізовано їх структури у воді методом ММ. Модель 19, була визначена найбільш стабільною. В оптимізованих структурах гексамерів, бічні ланцюги заряджених залишків Asp23 та Lys28 утворюють сольовий місток у кожному з шести мономерів (D, E, F, G, H, I), що веде до щільної упаковки Aβ гексамерів. У воді взаємодія між мономерами складеної Aβ пари вносить більший внесок у стабільність гексамерів, ніж взаємодія між мономерами тримерів. Збільшена енергія взаємодії в парах Lys28 та Asp23, His13 та Glu11, Arg5 і Glu3, а також Arg5 і Asp7 для мономерів D і G. Зокрема, енергія взаємодії пари Lys28 – Asp23 та His13 – Glu11 найбільша, що вказує на важливість цих пар для стабілізації Ab структури гексамера. Запропонована модель механізму агрегації Aβ: 1) Aβ-мономери складаються для утворення полімерів, таких як димери, тример тощо; 2) у цих полімерах виникає електростатична взаємодія групи NH_3+ бічного ланцюга Lys28 та групи COO^{-} бічного ланцюга Asp23 і можливо виникнення водневих зв’язків; 3) три полімери наближаються один до одного, щоб утворити тривимірну симетрічну фібрилу.

Конформаційні зміни β-амілоїдних мономерів в β-амілоїдних нонамерах. Як початкову використовували структуру PDB ID: 2M4J. Будували 20 моделей Aβ (1-40) нонамерів, кожна модель складалась з трьох складених шарів тримера Aβ (1-

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

Специфічні взаємодії між β-амілоїдними пептидами в β-амілоїдних фібрилах. Для аналізуваня *in vivo* Aβ фібрили побудували дві моделі Aβ гексамера. Формат структури PDB ID: 2M4J, складається з Aβ мономерів

A, B, C, D, E, F, G, H, I. Перший гексамер, який називається верхнім гексамером, складається з першого та другого шарів нонамера, а другий - нижчий гексамер утворюється з другого і третього шарів. Ці гексамери – це моделі для дослідження яких сили взаємодії між Аβ мономерами в тримері або між ними вносять значний вклад в стабілізацію нонамера. У верхньому гексамері мономери A і D, C і F, а також B і E складають відповідні пари, 1276 молекул води оточують ці Аβ пари, а також знаходяться в центральній порожнині Аβ гексамера. Молекули води суттєво сприяють стабілізації Аβ мономерів в Аβ гексамері. Дві молекули води утворюють мережу водневих зв'язків між бічними ланцюгами Glu22 (E) та Arg5 (F). Крім того, заряджена групи Arg5 (F) взаємодіє з COO^{-}групою Asp23 (E). Існує також взаємодія заряджених груп Lys28 (E) та Asp7 (F). Взаємодія мономерів E і F пов'язана з мережою водневих зв'язків з молекулами води, а також електростатичною взаємодією між зарядженими групами залишків. Модель для механізму агрегації Аβ: 1) Аβ мономери складаються для утворення полімерів, таких як димери, тример тощо. 2) полімери мають позитивні та негативні заряди на заряджених залишках повороту та N кінцевих областях. 3) три полімера наближаються один до одного для утворення фібрил. На цьому етапі електростатична взаємодія між зарядженими залишками в домені повороту та N-кінцевому домені і його сусіднім полімером сприяє руху цих залишків ближче один до одного і утворенню фібрил.

Вплив іона Zn на структуру та електронні стани β-амілоїдних наномерів. Агрегати Аβ тісно пов'язані з патогенезом AD. Агрегати Аβ різних розмірів від димерів до фібрил було виявлено у мозку хворих на AD. Крім цього, було виявлено і аномальне накопичення іонів металів Zn, Cu і Fe та асоціація між Аβ агрегатами і іонами цих металів. Досліджено вплив іонів Zn на стабільність Аβ-агрегатів з та без іонів Zn і зміни структури Аβ-агрегатів індукованих іонами Zn. Виявлено: 1) Структура Аβ-нонамера з тривимірною симетрією нестійка у воді. 2) В Аβ нонамері взаємодія між укладеними Аβ мономерами сильніша, ніж у мономерів, що утворюють Аβ тример в тому ж шарі. 3) Завдяки додаванню трьох іонів Zn до Аβ нонамера його структура відчутно стабілізується, щоб зберегти свою тривимірну

симетрію. 4) У комплексі (Aβ нонамер + Zn) два іони Zn координуються до негативно заряджених COO^- груп Glu11, що існують у N-кінцевій частині Aβ мономерів, сприяючи стабілізації комплекса.

Специфічні взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ. Туберкульоз (ТВ), одне з найпоширених інфекційних захворювань, яке викликано паличкою *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). FtsZ відіграє важливу роль у формуванні клітинних стінок в процесі клітинного ділення. FtsZ має сайт звязування з гуанозинтрифосфатом (GTP). Коли FtsZ утворює Z-кільце, як показано, GTP зв'язується з GTP-сайтом зв'язування FtsZ. Згодом сайт петлі T3 FtsZ координує до GTP, утворюючи стабільний комплекс FtsZ димерів, які утворюють волокнистий агрегат. Крім того, сайт петлі T7 FtsZ діє на GTP сусіднього FtsZ і гідролізує GTP до гуанозиндифосфату (GDP). Zantrin Z3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl]benzo[g]quinazolin-4-yl]-N',N'-diethylethane-1,2-diamine) та його диметил ZZ3 (N-[2-[(E)-2-(4-Chlorophenyl)ethenyl] benzo[g] quinazolin-4-yl]-N',N'-dimethyl-1,2-diamine досліджували як інгібітори та їх специфічні взаємодії з FtsZ. Оскільки сайти зв'язування FtsZ з інгібіторами Z3 і ZZ3 не визначено, можливі сайти зв'язування обирали. Перш за все, сайт GTP / GTP FtsZ + GDP комплекс (PDB ID: 1RQ7) був визначений A-сайтом. Структура FtsZ передбачала сім сайтів кандидатів на зв'язування з Z3 та ZZ3, ці сайти були визначені як B, C, D, E, F, G та H. З'ясовано особливості взаємодії Z3 та ZZ3 з FtsZ та уточнено структурні особливості їх зв'язування: 1) Z3 та ZZ3 зв'язуються з B-сайтом, що містить петлю H6/H7 і H7, а не з місцем зв'язування GTP / GDP до FtsZ; 2) ZZ3 має більш високу спорідненість до FtsZ, ніж Z3; 3) Met163, Gly164, Ser176, Glu179 та Ala235 сприяють зв'язуванню ZZ3 з FtsZ; 4) Z3 та ZZ3 ефективні для інгібування агрегації FtsZ шляхом зміни конформації петлі H6/H7, що сприяє агрегації. 5) На основі ZZ3 можливо запропонувати більш потужні інгібітори, які зв'язують сильніше з B-сайтом петлі H6 / H7 FtsZ.

Взаємодія куркуміну і його похідних з β-амілоїдним пептидом: молекулярне моделювання методом *ab initio*. AD викликана накопиченням β-амілоїдних пептидів у мозку людини. Aβ пептид утворюються як шляхом

розщеплення β-секретазою, так і γ-секретазою білка-попередника амілоїду (APP). Для придушення продукції цих патогенних пептидів необхідно мати інгібітори процесу розщеплення APP, сполуки, які специфічно зв'язуються з місцем розщеплення APP та інгібують атаки γ-секретази. APP має 770 залишків і складається з трьох доменів; 1) N-кінцевий ектодомен (залишки 18–624), що знаходиться в позаклітинному просторі, 2) одинарний гідрофобний трансмембраний домен (TMD, залишки 625–648) та 3) короткий внутрішньоклітинний домен (AICD, залишки 649–695). Двоступеневим розщепленням APP β- та γ-секретазами, утворюються Aβ пептиди, що мають 37–43 амінокислотні залишки. 28 залишків у пептиді належать до позаклітинного домену, тоді як інші залишки належать до мембранного домену. Aβ42 та Aβ40 утворюються з розщеплення APP γ-секретазою в місцях Ala713 та Val711, відповідно. Утворення пептидів Aβ42 та Aβ40 запобігається шляхом зв'язування деяких пептидів із сайтом розщеплення APP γ-секретазою.

Як початкову структуру APP використовували структуру (PDB ID: 2LZ3), що є частковою структурою APP770, що складається з 28 амінокислот від залишків Lys699 до Lys726 APP770. Місце розщеплення APP770 за допомогою γ-секретази – Ala713 для отримання Ab 42 і Val711 для виробництва Ab 40, відповідно. Далі цей короткий пептид APP позначається APP28. Ala713 APP770 відповідає Ala19 APP28, тоді як Val711 APP770 відповідає Val17 APP28. Нумерація залишків зміщена на 694 з APP770 на APP28. Дослідження стабільних структур комплексів (APP + куркумін) у воді виявили, що куркумін I зв'язується з APP таким чином, що покриває сайт розщеплення APP γ-секретазою і може завадити розщепленню APP. Взаємодію можна посилити шляхом введення деяких груп в центральну частину куркуміну I. Визначено, що куркумін VI має найбільшу енергію зв'язування з APP серед запропонованих похідних куркуміну. Куркумін VI охоплює сайт Ala19 APP і може бути інгібітором утворення Aβ42. Куркумін XIV зв'язується з APP та взаємодіє електростатично із залишком APP Ala19 і потенційно може захистити місце розщеплення Ala19 APP від атаки γ-секретази і зменшує можливість вироблення патогенного пептида Aβ42. Природні сполуки з спорідненістю до

зв’язування з Aβ також можуть бути ефективними для запобігання агрегації Aβ та лікування AD. Кверцетин (PDB: 2O3P), EGCG (PDB: 3OOB), апігенін (PDB ID:4WO0) і куркумін-I (PDB ID: 5ZTN) було запропоновано як інгібітори-кандидати Aβ агрегації. Енергія взаємодії (BE) куркуміну-Ib набагато більша ніж у інших інгібіторів Aβ. Основною причиною такої великої BE є сильна взаємодія між куркуміном-Ib та Lys16. Замінивши групу OCH_3 OH-групою в куркуміні-I стерично об'ємна частина куркуміну-I зникає. В результаті куркумін-Ib може потрапляти в ліганд ділянку зв'язування Aβ легше і утворює багато водневих зв’язків з залишками Aβ.

Взаємодія куркуміну з сайтами рестрикції АβРР. Куркумін здатен взаємодіяти з агрегатами і фібрилами β-амілоїдних пептидів, крім того не виключена можливості взаємодії куркуміну з сайтами процесінгу АβРР відповідними секретазами. Досліджено моделюванням *in silico* молекулярного докінгу куркуміна з трьома сайтами рестрикції АβРР для α-, β- і γ-секретаз, відповідно. Побудовано 8 моделей фрагменту АβРР з 63 залишків (АβРР_63Rat: I_{661}-L_{723}), який включав усі сайти рестрикції і Aβ. Відібрано дві моделі, які мали кращі показники конформаційних і енергетичних коливань. Відібрано три сайти ензимної рестрикції АβРР_63Rat: I– M11-D12; II – K27-L28; III – V51-I52. У побудованих моделях сайт III припав на неструктуровані і рухливі ділянки пептиду, що обумовлює неможливість зв’язування молекули куркуміну в даній ділянці. Тоді як сайти I та II мали більш вигідну структуру для зв’язування. Докінг куркуміну з АβРР_63Rat, який вміщував всі три сайти протеолізу, показав можливість утворення стійких комплексів між куркуміном та I і II сайтами рестрикції протеїну попередника Aβ. Куркумін не лише виступає деструктором уже сформованих агрегатів β-амілоїдних пептидів, а й може втручатися у процес утворення їх мономерів шляхом взаємодії з сайтами ензимного протеолізу АβРР.

I661-L723 β-секретаза α-секретаза γ-секретаза

IKTEEISEVK AEFGHDSG FEVRHQ VF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV ATVIVITL

Взаємодія похідних куркуміну з Tau протеїном: молекулярний докінг та

молекулярне моделювання методом *ab initio*. У мозку хворих на AD є шість ізоформ Tau білків. Розміри цих білків варіюють від 352 до 441 амінокислотних залишків. Ці білки утворюють нейрофібрилярні клубки, в яких є парні спіральні філаменти (PHF), які виникають за рахунок подвійного спірального укладання С-подібних субодиниць Tau -білка. Існує гіпотеза, що утворення цих PHF тісно пов'язано з гіперфосфорилюванням білка Tau, яке обумовлено додаванням фосфатних груп до амінокислот, таких як серин, треонін і тирозин. Це гіперфосфорилювання порушує здатність Tau білка зв’язуватися з мікротрубочкою, що призводить до його відокремлення від мікротрубочки та агрегації в нейрофібрилярні клубки. Досліджено специфічні взаємодії між Tau білком та куркуміном і його похідними 2B, 2C, 3A, 3E and PE859. З’ясовано, з якими з цих похідних Tau білок зв’язується сильніше і це може пригнічувати йго агрегацію. Ланцюг мономера А у Tau - філаменті (PDB ID: 5O3L) використовували як початкову структуру Tau білка, ефект сольватації білка моделювали молекулами води шаром 8 Å навколо нього. Енергія взаємодії (BE) між куркуміном та його похідними і Tau білком вираховували із сумарних енергій (TE) складових комплекса, використовуючи наступне рівняння.

BE = TE (комплекс + вода) - TE (Tau + вода) - TE (похідні + вода) + TE (вода)

Показано, що PE 859 має найнижчу BE серед досліджених похідних. Через групу піразолів у центрі PE 859 зв’язується з багатьма залишками амінокислот білка Tau. Модифікація індольного кільця PE 859 призводить до посилення взаємодії з Tau білком.

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

води, в межах 8 Å від поверхні комплекса).

Енергію взаємодії (ВЕ) між FtsZ та куркуміном вираховували із сумарних енергій (ТЕ) складових комплеекса, використовуючи рівняння:

ВЕ = - ТЕ (комплекс + вода) + ТЕ (FtsZ + вода) + ТЕ (куркумін + вода) – ТЕ (вода)

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

Вплив Аβ (42) на динаміку експресії та утворення Аβ (40), IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 у мононуклеарах і когнітивні характеристики щурів із моделлю хвороби Альцгеймера та його корекція куркуміном. Вивчали дію куркуміну (щоденна доза 3,5 μг/тварину) у двох формах: водний розчин і у складі ліпосом. Гомоагрегати $A\beta_{42}$ в гіпокампі щурів з експериментальною моделлю AD викликали хронічне нейрозапалення специфічно гіпокампальні рівні IL-1β і IL-10 щурів з експериментальною моделлю AD були збільшені в порівнянні з контрольною групою (на 221 % і 111 %, відповідно) і групою 2 (на 110 % і 78 %, відповідно). В неокортексі головного мозку цих щурів, також була виявлена активація запального процесу, хоча і меншою мірою: збільшення рівнів IL-1β (на 109 %) і IL-6 (на 54 %). Ефект водного розчину куркуміну у неокортексі щурів виявив специфічне інгібування цитокінової запальної активації: нормалізувались рівні IL-1β, IL-6; рівень TNFα знижувався на 49 %, концентрація IL-10 не змінювалась. У гіпокампі тварин дія куркуміну на цитокінові показники позначилась аналогічною спрямованістю. Проте, концентрація жодного з цитокінів не нормалізувалась,

натомість зростав рівень IL-6 (на 49 %) і IL-10 (на 83 %), порівняно з показниками на початок місяця. Але за порівняння показників цитокінів гіпокампу щурів груп 3 і 4 стає зрозумілим специфічне зниження рівнів IL-1β (на 33 %), TNFα (на 24 %), IL-6 (на 34 %) і IL-10 (на 99 %), обумовлене інгібуючою дією куркуміну (табл. 5). Антицитокіновий ефект куркуміну можна пояснити його здатністю інгібувати активацію запального фактору транскрипції NFκB, пригнічуючи фосфорилювання і деградацію IκBα (інгібітору NFκB) (табл. 4 і табл. 5). Вплив ліпосомного куркуміну на цитокінові показники у гіпокампі тварин з інтрагіпокампальним введенням Aβ42_Human позначився суттєвим пригніченням запалення: рівень TNFα зменшився на 56 %, IL-6 – на 39 %, IL-10 – на 52 %, відповідно. Проте, концентрація жодного з цитокінів не нормалізувалась. Ефект куркуміну у складі ліпосом у неокортексі щурів з моделлю AD виявив аналогічне пригнічення цитокінової реакції: рівень TNFα зменшився на 71 %, IL-6 – на 67 % і IL-10 – на 41 %, відповідно. У гіпокампі щурів з моделью AD ліпосомальна форма куркуміну виявила більш інтенсивне пригнічення цитокінової ланки нейрозапалення, порівняно з його водним розчином.

Таблиця 4

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

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

Примітка. Тут і далі контроль – інтактні щури; група 1 – тварини з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера (інтрагіпокампальна дія Aβ42_Human); група 2 – фальш-оперовані щури; група 3 – назальна терапія куркуміном у ліпосомах щурів з моделлю AD; група 4 – назальна терапія порожніми ліпосомами щурів з моделлю AD.

Таблиця 5

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

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

Назальна терапія водним розчином куркуміну у щурів з моделлю доклінічного етапу AD (інтрагіпокампальне введення гомоагрегатів $A\beta_{42}$) обумовила зменшення вмісту цитокінів і пригнічення ангіотензин перетворювальної активності в головному мозку, але не в сироватці крові цих тварин (табл. 6). У результаті терапії куркуміном відзначалося поліпшення пам’яті дослідних щурів. Виявлена позитивна динаміка антизапального впливу водного розчину куркуміну *in vitro* на транскрипційному і трансляційному рівнях утворення цитокінів мононуклеарами, а також встановлено його безпосередній пригнічуючий ефект на рівень ендогенного $A\beta_{40}$ за умов токсичної дії екзогенного $A\beta_{42}$. Встановлено, що гомоагрегати $A\beta_{42}$ викликали накопичення ендогенного $A\beta_{40}$ у мононуклеарах. Куркумін істотно запобігав збільшенню концентрації $A\beta_{40}$ у клітинах та вірогідно зменшував його секрецію, обумовлену токсичним впливом екзогенного $A\beta_{42}$. Для прозапальних цитокінів (IL-1β і TNFα) за інкубації мононуклеарів *in vitro* з екзогенним $A\beta_{42}$ було встановлено збільшення внутрішньоклітинного вмісту TNFα і відсутність накопичення IL-1β у клітинах.

Додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект $A\beta_{42}$ на мононуклеарний пул цих цитокінів, що позначилося зменшенням їх позаклітинного пулу. Динаміка накопичення і секреції IL-6 мононуклеарами характеризувала цей інтерлейкін другої хвилі запальної відповіді, як не схильного до внутрішньоклітинного накопичення. Токсична дія $A\beta_{42}$ пригнічувала накопичення IL-10 в мононуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Додавання куркуміну

відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

Таблиця 6

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

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

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

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

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

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

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

7. За допомомогою методів докінгу і молекулярної динаміки встановлено що куркумін може втручатися у процес утворення Аβ-мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесінгу попередника β-амілоїдних пептидів (АβРР_63Rat). Показано можливість утворення стійких комплексів між куркуміном та I і II сайтами рестрикції протеїну попередника Аβ. Куркумін не лише виступав деструктором уже сформованих агрегатів β-амілоїдних пептидів, а й впливав на процес утворення їх мономерів шляхом взаємодії з сайтами ензимного протеолізу АβРР.

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

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

10. Для прозапальних цитокінів (IL-1β і TNFα) за інкубації мононуклеарів *in vitro* з екзогенним $A\beta_{42}$ було встановлено збільшення внутрішньоклітинного вмісту TNFα і відсутність накопичення IL-1β у клітинах, Додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект $A\beta_{42}$ на мононуклеарний пул цих цитокінів, Токсична дія $A\beta_{42}$ пригнічувала накопичення IL-10 в мононуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний пул цього протизапального інтерлейкіну.

11. Отримані дані науково обґрунтовують впровадження нових підходів у використанні знежиреного лецитину соняшника як сировини для створення нанорозмірних контейнерів – ліпосом для транспортування фармакологічно активних інгредієнтів і стратегію лікування хвороби Альцгеймера із врахуванням ключової ролі ліпосомальної форми флавоноїдів.

Результати дослідження мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії мономерів амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера.

СПИСОК ДОДАТКОВО ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Calixto J. B., Kassuya C. A. L., Silvestre A. A., Rehder V. L. G. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from Phyllanthus amarus in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology.* 2003. Vol. 478, No 2-3. P.145-153.

2. Calixto J. B. , Campos M. M., Otuki M. F., Santos A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica.* 2004. Vol. 70, No 2. P. 93-103.

3. Yao K.S.A., Kimse M., Soro D., Fantodji A. Effet de l'incorporation de la noix de cajou dans les rations alimentaires sur les performances de croissance des porcs : phases post-sevrage et de croissance. *International Journal of Biological and Chemical Sciences Abbreviation*. 2013. Vol. 7, No 2. P. 479-488.

4. Masuda S., Terada T., Yonezawa A., Tanihara Y., Kishimoto K., Katsura T., Ogawa O., Inui K. Identification and functional characterization of a new human kidney-specific H+/organic cation antiporter, kidney-specific multidrug and toxin extrusion 2. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2006. Vol. 17, No 8. P.2127-2135.

5. Egan L. J., Colombel J.-F., Jr E.V. L., Tremaine W. J., Harmsen W. S., Schleck C. D., Zinsmeister A. R., Sandborn W. J. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology*. 2004. Vol. 126, No 1. P. 19-31.

6. Mohanty N., Moore D.,Xu Z., Sreeprasad T.S., Nagaraja A., Rodriguez A. A., Berry V. Nanotomy-based production of transferable and dispersible graphene nanostructures of controlled shape and size. *Nature Communications*. 2012. Vol. 3, Article number: 844.

7. Zaru R. , Ronkina N., Gaestel M., Arthur C. S. J., Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways *Natural Immunology.* 2007. Vol.8, No 11. P. 1227-1235.

8. Zaru M., Manca M. L., Sophia A.M. F.Antimisiaris Chitosan-coated liposomes for delivery to lungs by nebulisation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 2009. Vol. 71, No 1. P:88-95.

9. Liang P., Xu Y., Zhang X., Ding C., Huang R., Zhang Z., Lv J., Xie X., Chen Y.I., Li Y., Sun Y., Bai Y., Songyang Z., Ma W., Zhou C., Huang J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015. Vol. 6, No 5. P. 363–372.

10. Manca A. , Capsoni S., Luzio A. D., Vignone D., Malerba F., Paoletti F., Brandi R., Arisi I., Cattaneo A., Levi-Montalcini R. Nerve growth factor regulates axial rotation during early stages of chick embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*. 2012. Vol. 109, No6. P.2009-2014.

11. Manca I. , Mastinu A., Olimpieri F.,Falzoi M., Sani M., Ruiu S.,Loriga G., Volonterio A., Tambaro S., Bottazzi M. E. H., Matteo Zanda, Pinna G.A., Lazzari P. Novel pyrazole derivatives as neutral CB antagonists with significant activity towards food intake. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2013. Vol. 62. P. 256-269.

12. Charles D., Delatour B., Potier M.-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*. 2009. Vol. 118. P 5–36.

13. Vassar R., Kovacs D. M., Yan R., Wong P. C. The β-Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *The Journal of Neuroscience*. 2009. Vol. 29, No41. P. 12787–12794.

ДОДАТОК
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Sato R, Vohra S, Yamamoto S, Suzuki K, Karpov P, Blume Y, **Shulga S,** et. al. Specific interactions between tau protein and curcumin derivatives: Molecular docking and *ab initio* molecular orbital simulations. J. Mol. Graphics Model. 2020; 98: 107611. https://doi.org/10.1016/j.jmgm. *(Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

2. Sogawa H, Tomioka S, Shinzato T, Karpov P, **Shulga S,** Blume Ya, et. al. Binding sites of Zantrin inhibitors to the bacterial cell division protein FtsZ: molecular docking and *ab initio* molecular orbital calculations. Chem. Physics. 2020; 530: 1-10. doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110603 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

3. Tomioka S, Sogawa H, Shinzato T, Ishimura H, Okamoto A, Blume Y, **Shulga S,** et. al. Effect of Zn ion on the structure and electronic states of Aβ nonamer: molecular dynamics and *ab initio* molecular orbital calculations. Mol. Simulation. 2019; 45(9): 706-715, doi: 10.1080/08927022.2019.1579328. (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

4. Shinzato T, Sato R, Suzuki K, Tomioka S, Sogawa H, **Shulga S,** et. al. Proposal of therapeutic curcumin derivatives for Alzheimer's disease based on *ab initio* molecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2019; 738: 136883. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136883. (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

5. Fujimori M, Sogawa H, Ota S, Karpov P, **Shulga S,** Blume Y, et. al. Specific interactions between mycobacterial FtsZ protein and curcumin derivatives: Molecular

docking and ab initiomolecular simulations. Chem. Phys. Lett. 2018; 692: 166-173 https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.12.045 (*Особисто дисертан- том запропоновано дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

6. Ishimura H, Tomioka S, Kadoya R, Shimamura K, Okamoto A, **Shulga S,** et. al. Specific interactions between amyloid-β peptides in an amyloid-β hexamer with three-fold symmetry: *Ab initio* fragment molecular orbital calculations in water. Chem. Phys. Lett. 2017; 672: 13-20. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.041 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

7. Ota S, Fujimori M, Ishimura H, **Shulga S**, Kurita N. Proposal for novel curcumin derivatives as potent inhibitors against Alzheimer's disease: *Ab initio* molecular simulations on the specific interactions between amyloid-beta peptide and curcumin. Chem. Phys. Lett. 2017; 685: 482-489. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.08.024 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

8. Melnyk A, Sukhoveev O, Kononets L, Khilchevsky O, **Shulga S,** Kukhar V, et al. An EPR spin probe study of liposomes from sunflower and soybean phospholipids. J. Liposome Res. 2016; 26(1): 80-86, DOI: 10.3109/08982104 2015.1039031. (*Особисто дисертантом проведено частину експериментальнах досліджень, статистичний аналіз, формулювання висновків та написання статті*) **Q1**

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

10. Ishimura H, Kadoya R, Suzuki T, Murakawa T, **Shulga S,** Kurita N. Specific interactions between amyloid-β peptide and curcumin derivatives: *ab initio* molecular

simulations. Chem. Phys. Lett. 2015; 633: 139-145. https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.023 (*Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*) **Q2**

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

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

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

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

4. Ishimura H, Kadoya R, Shimamura K, Ota S, Fujimori M, Okamoto A, **Shulga S**, et. al. *Ab initio* fragment molecular orbital calculations on the specific interactions between amyloid-β peptides in an *in vivo* amyloid-β fibril. Proc. of the 2016 Int. Conference on Advanced Informatics, Computational Science & Engineering, 2016,

Penang, Malaysia, p. 1-9. doi:10.1109/icaicta.2016.7803094 (*Особисто дисертантом запропоновано дизайн дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті*).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. **Шульга СМ.** Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво. Biotechnol. Acta. 2013; 6(5): 19-40. doi: 10.15407/biotech6.05.019

15. Хробатенко ОВ, Притульська НВ, **Шульга СМ.** Створення та дослідження ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. Biotechnol. Acta. 2013; 6(3): 110-115. (*Особисто дисертантом проведено аналізування даних літературних джерел, обговорення результатів, формулювання висновків та написання статті*).

16. **Шульга СМ**, Глух ИС, Глух АИ, Дроздов АЛ, Школа ОИ. Разработка технологии получения сухого лецитина из фосфатидного концентрата подсолнечника. Наука та інновації. 2012; 8 (5): 62-71. (*Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті*).

17. **Шульга СМ,** Глух ІС, Дроздов ОЛ. Біологічні властивості лецитину соняшника. Наукові праці Одеської нац. академії харчових технологій. 2012; 42(1): 234-238. (*Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналізування і обговорення отриманих результатів та написання статті*).

Монографії:

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

Патенти:

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

4. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ**, Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90512. 2014 Трав 26.

5. Глух АІ, Глух ІС, **Шульга СМ**, Дроздов ОЛ, винахідники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ, патентовласники: Глух АІ, Глух ІС, Шульга СМ, Дроздов ОЛ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №90511. 2014 Трав 26.

6. Притульська НВ, Хробатенко ОВ, **Шульга СМ**, винахідники: Притульська НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ, патентовласники: Притульська НВ, Хробатенко ОВ, Шульга СМ. Спосіб отримання ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування. Патент на корисну модель №77865. 2013 Лют 25.

7. **Шульга СМ,** Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, винахідники; Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ, патентовласники: Шульга СМ, Глух АІ, Глух ІС, Школа ОІ. Спосіб виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату. Патент на корисну модель №54922. 2010 Лист 26.

Тези доповідей:

1. **Шульга СМ**, Глух ИС, Гаманухо ВИ, Школа ОИ, Терещенко СИ. Создание производства пищевой и биологически активной добавки «Лецитин» из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Сборник статей научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии. Роль биологически активных пищевых добавок в обеспечении здоровья населения»; 6-7 ноября 2003 г.; Днепропетровск; 2003; с. 96-97.

2. **Шульга СМ**, Глух ИС, Гаманухо ВИ, Школа ОИ, Терещенко СИ. Разработка и внедрение производств получения пищевой и биологически активной добавок «Лецитин». В: Матеріали науково-практичної конференції «Харчові добавки, інгредієнти, БАДИ: їх властивості та використання у виробництві продуктів і напоїв»; 30.06 – 4.07. 2003 р., Феодосія, АР Крим, Київ: «Знання»; 2003; с.68-70.

3. **Sergiy M Shulga**, Igor S Glukh. Dry powder lecithin and liposomal nanoemulsions

from sunflower. In: 10th ILPS phospholipid congress; 16-18 September 2011; Rotterdam, the Netherlands. https://orbit.dtu.dk

4. **Шульга СМ**, Глух ИС, Иващенко ТА. Получение L-α-лецитина и липосомальных наноэмульсий из подсолнечного фосфатидного концентрата. В: Тезисы докладов VI Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 21-25 марта 2011 г.; Москва; 2011; с. 435.

5. **Shulga S**, Glukh I. Liposomes and liposomal nanoememulsions from sunflower. In: 15th European Congress on Biotechnology; 23-26 September 2012; Istanbul, Turkey: «New biotechnology»; 2012; V. 29, Issue S, p. S127. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.08.355 **Q2**

6**. Shulga S**, Glukh I. Technology of Dry Powder Sunflower Lecithin for Food, Feed and Pharmaceuticals. In: 103rd AOCS Annual Conference & Expo; April 29-May 2, 2012; Long Beach, California, USA; 2012. file:///H|/Amie/abstracts/am2012/Phospholipid.htm

7**.** Shulga S, Glukh I, Drozdov O. Biological properties of deoil sunflower lecithin. In: 104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H|/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm

8. **Shulga S**, Glukh I, Danilov V. Multiscale molecular simulation and experimental investigation of sunflower phospholipids liposomes using for scavenging free radicals. In: 104 AOCS Annual Meeting & Expo; April 28–May 1, 2013; Montreal, Canada; 2013. file:///H|/Amie/abstracts/am2013/Phospholipid.htm

9. **Шульга СМ**, Глух ИС, Дроздов АЛ. Биологические свойства обезжиренного лецитина из подсолнечника. В: Тезисы докладов VII Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»; 19 – 22 марта 2013; Москва; 2013; с. 73.

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

11**.** Мельник АК, Суховєєв ОВ, Кононець ЛА, Хільчевський ОМ, **Шульга СМ**, Іващенко ТА, Трачевський ВВ, Кухар ВП, Вовк АІ. Порівняльна характеристика

ліпосом з соняшникового лецитину: дослідження методом спінових зондів. В: Матеріали XXIII Української конференції з органічної хімії, присвяченої 95-річчю заснування НАН України; 16-20 вересня 2013; Чернівці; 2013; с. 248.

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

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

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

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

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

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