

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПОСОМНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА АНТИОКСИДЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И МОЗГА МЫШЕЙ

© 2020 г. Н.Н. Сажина, М.Г. Семенова, А.С. Антипова, Е.И. Мартиросова, Н.П. Пальмина

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*

*E-mail: natnik48s@yandex.ru*

Поступила в редакцию 19.03.2020 г.

После доработки 31.03.2020 г.

Принята к публикации 02.04.2020 г.

В настоящее время большое внимание уделяется разработке и созданию эффективных систем доставки незаменимых омега-3-полиненасыщенных жирных кислот и других нутрицевтиков в организм человека через пищевые системы. Одними из таких систем доставки являются наноконплексы на основе липосом соевого фосфатидилхолина с включенными нутрицевтиками, длительное потребление которых может оказать влияние на антиокислительный статус различных органов и тканей. В работе методом термоиницированной хемилюминесценции проведено исследование изменения антиокислительной активности плазмы крови, липидов печени и мозга шести групп мышей в зависимости от состава липосомных наноконплексов, введенных в напитки, заменяющие воду, в их длительную (трехмесячную) диету. Компонентами шести видов липосомных наноконплексов, кроме фосфатидилхолина, в разном сочетании служили: эфирное масло гвоздики, рыбий жир и казеинат натрия. Показано, что наноконплексы, содержащие липосомы из фосфатидилхолина с добавлением в них рыбьего жира, эфирного масла гвоздики и инкапсулированных молочным белком казеинатом натрия, оказались самыми эффективными в отношении увеличения антиокислительной активности плазмы крови и липидов мозга мышей по сравнению с контролем.

*Ключевые слова: функциональные нутрицевтики, липосомы, эфирное масло гвоздики, рыбий жир, казеинат натрия, антиокислительная активность, хемилюминесценция.*

DOI: 10.31857/S0006302920040183

Известно, что суммарная антиокислительная активность (АОА) различных органов и тканей является важным показателем для оценки состояния организма и его устойчивости к повреждающим воздействиям и развитию многих заболеваний [1–7]. К изменению этой величины могут приводить как различные физические факторы, так и введение в организм веществ как искусственного, так и природного происхождения, их смесей, растительных экстрактов и масел [1–10]. Степень влияния всех перечисленных воздействий на АОА зависит от антирадикальной и антиокислительной активности вводимых веществ, их взаимодействия друг с другом и теми антиок-

сидантами, которые содержатся в органах и тканях экспериментальных животных [1, 8, 9].

В настоящее время широкое распространение получила идея введения в рацион питания дополнительного количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Данное предложение связано с тем, что, с одной стороны, ПНЖК играют важную роль в поддержании ряда физиологических функций организма животных и человека (рецепторных, противовоспалительных, регуляторных) [11–15], а с другой – они не синтезируются в организме млекопитающих и потребляются с пищей. Наиболее оптимальным для усвоения *in vivo* является соотношение ПНЖК (омега-6 : омега-3 = 1:1 – 4:1) [15]. Однако создание таких продуктов, обогащенных ПНЖК, сопряжено с определенными трудностями, обусловленными тем, что высокое содержание ненасыщенных углерод-углеродных связей в их молекулах способствует их окисляемости и деградации с образованием токсичных продуктов: гид-

*Сокращения:* АОА – антиокислительная активность, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ФХ – фосфатидилхолин, ЭМГ – эфирное масло гвоздики, Каз-Na – казеинат натрия, РЖ – рыбий жир, АСВ – суммарная антиокислительная емкость водорастворимых соединений плазмы крови, АСЛ – антиокислительная емкость жирорастворимых соединений в липидах, ХЛ – хемилюминесценция.

роперекисей, кетонов и альдегидов. Кроме того, липофильная природа ПНЖК затрудняет их введение в низкожирные или имеющие 0% жирности продукты питания.

В работах [16, 17] был выполнен цикл исследований, посвященных созданию и всестороннему изучению физико-химических свойств наноконструкций пищевых биополимеров с липосомами соевого фосфатидилхолина (ФХ), обогащенных незаменимой растительной омега-3 ПНЖК в отсутствие и в присутствии растительного антиоксиданта – эфирного масла гвоздики (ЭМГ). Однако оставался открытым вопрос о биодоступности и степени биоусвоения омега-3 ПНЖК и ЭМГ из биополимерных наноконтейнеров в живом организме при их пероральном употреблении. В частности, длительный прием липосомальных комплексов может существенно изменить не только уровень ПНЖК в липидах, но и оказать влияние на такой показатель, как суммарную антиокислительную активность различных органов и тканей.

В литературе представлены работы, связанные с оценкой влияния приема растительных и эфирных масел, антиоксидантов и других биологически активных добавок на состав липидов органов мышей, их общеклинические показатели, активность некоторых антиоксидантных ферментов и уровень АОА [10, 18–22]. Например, в работе [10] методом фотохемилуминесценции исследовали АОА шести разных растительных масел и влияние их пятнадцатисуточного приема на АОА липидов сыворотки крови крыс. Установлено значительное различие (в два-четыре раза) суммарной АОА масел между собой, а также высокая корреляция (~0.95) между АОА масел и АОА липидов сыворотки крови. Работы по изучению влияния на антиокислительный статус организма *in vivo* состава водорастворимых липосомных наноконструкций, включающих различные нутрицевтики и длительно принимаемых перорально, в литературе отсутствуют.

Цель настоящей работы – изучить *in vivo* влияние состава водорастворимых липосомных наноконструкций, принимаемых перорально, на антиокислительную активность плазмы крови, а также липидов печени и мозга у экспериментальных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использовали фосфатидилхолин фирмы Lipoid GmbH (Германия) следующего химического состава по данным фирмы: фосфолипиды – 94% фосфатидилхолина, 0.6% фосфатидил-

эаноламина, 3% лизофосфатидилхолина, 0.1% фосфатидилинозита; триглицериды – 2%; свободные жирные кислоты – 0.5%;  $\alpha$ -токоферол – 0.15%. Использовали также казеинат натрия (Каз-Na) фирмы Sigma (Новая Зеландия); органические растворители фирмы Merck (Германия); эфирное масло гвоздики фирмы Plant Lipids Ltd (Индия); рыбий жир (концентрат омега-3 «Омега-3 дети», ООО «РУСКАПС», Москва); аскорбиновая кислота (Sigma, США); тролокс™ (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) фирмы Aldrich (США). В китах ARA-W (для определения антирадикальной активности водорастворимых соединений) и ARA-L (для определения антирадикальной активности жирорастворимых соединений) фирмы Oxidaq UG Ltd. (Германия) содержатся соответственно 2,2'-азо-бис(2-метил-пропионамидин)дигидрохлорид и 2,2'-азо-бис(2,4-диметил-валеронитрил) фирмы Wako-chemicals (Япония).

**Приготовление растворов липосомных наноконструкций.** В экспериментах были использованы водные растворы шести видов липосомных наноконструкций в качестве напитков, заменяющих воду в диете экспериментальных животных:

*Диета 1.* Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 2.50 мг/мл).

*Диета 2.* Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) (с концентрацией в растворе [ФХ] = 2.50 мг/мл). Весовое отношение компонентов липосомного наноконструкционного комплекса: ФХ : ЭМГ = 1 : 0.02.

*Диета 3.* Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные казеинатом натрия (Каз-Na) (с концентрацией в растворе [Каз – Na] = 16.6 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном наноконструкционном комплексе: ФХ : Каз-Na = 1 : 10.

*Диета 4.* Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ (2% от веса ФХ) ([ФХ] = 2,50 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 25,0 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном наноконструкционном комплексе ФХ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 0,02 : 10.

*Диета 5.* Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (РЖ) (с концентрацией в растворе [РЖ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном наноконструкционном комплексе ФХ : РЖ : Каз-Na = 1 : 1 : 20.

*Диета 6.* Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл) с добавлением рыбьего жира (с концентрацией в растворе [РЖ] = 1.66 мг/мл) и ЭМГ (2% от веса ФХ + РЖ), инкап-

сулированные Каз-На (с концентрацией в растворе  $[Каз-На] = 33.3$  мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомном наноконплексе: ФХ : РЖ : ЭМГ : Каз-На = 1 : 1 : 0.02 : 20.

**Приготовление липосом.** Липосомы ФХ с добавлением ЭМГ и/или РЖ готовили по следующей методике: в стерилизованные при  $110^{\circ}C$  (30 мин) стеклянные стаканчики взвешивали необходимые навески ФХ/ЭМГ/РЖ. Добавляли в них расчетное количество свежеекипяченой бидистиллированной воды, диспергировали ФХ/ЭМГ/РЖ в воде при помощи трехкратной механической гомогенизации, используя гомогенизатор (Heidolph, Германия), в течение 2 мин при 20000 об/мин. Полученную водную дисперсию ФХ/ЭМГ/РЖ дополнительно обрабатывали ультразвуком для получения наноразмерных липосомных комплексов, используя при этом ультразвуковой гомогенизатор VCX-130 (Sonics & Materials, США) в подобранном предварительно режиме: озвучивание в течение 5 мин при 40% мощности сигнала (отношение времени озвучивания к времени без озвучивания 30 с : 30 с). При озвучивании образец охлаждали во льду. Для получения наноразмерных липосомных комплексов такой режим озвучивания повторяли семикратно. После этого проводили центрифугирование полученных водных растворов липосомных комплексов ФХ/ЭМГ/РЖ в стерилизованных (при  $110^{\circ}C$ , 30 мин) центрифужных пробирках в течение 30 мин при 4000 об/мин (1800 g) для удаления металлической стружки от ультразвукового зонда. Инкапсулирование белком (Каз-На) приготовленных липосом (ФХ/ЭМГ/РЖ) проводили смешением их растворов в стерилизованных (при  $110^{\circ}C$ , 30 мин) бутылочках для кормления с последующим их встряхиванием (165 об/мин) в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) при  $40^{\circ}C$  в течение 1 ч. После этого повышали температуру в шейкер-инкубаторе до  $63^{\circ}C$  и пастеризовали все приготовленные растворы в течение 30 мин при их продолжающемся встряхивании (165 об/мин).

Все приготовленные растворы липосомных наноконплексов готовили на двое суток из расчета их потребления одной мышью в объеме 7 мл ежедневно.

**Животные и дизайн эксперимента.** 50 мышей линии F1(C57blxDBA2\6) массой 18–20 г из вивария «Столбовая» (Московская область) были разделены на восемь групп по шесть-семь мышей в каждой группе. Мышей содержали на диете в течение 92 суток.

I группа животных (семь особей) получала общевиварный рацион и была забита методом декапитации в первый день эксперимента. II группа (шесть особей) получала диету 1; III группа (шесть особей) – диету 2; IV группа (шесть особей) – диету 3, V группа (шесть особей) – диету 4; VI группа (шесть особей) – диету 5; VII группа (шесть особей) – диету 6; VIII группа (семь особей) содержалась на общевиварном рационе все 92 суток эксперимента и была забита в конце опыта. Через 92 суток после начала приема различных диет мыши были забиты методом декапитации, а плазма крови, ткани печени и головного мозга животных были взяты для исследования их антиокислительной активности. Кровь собирали в пробирки с 5%-м раствором цитрата натрия, центрифугировали при 1300 g и комнатной температуре 10 мин, отделяли плазму крови.

**Выделение липидов из плазмы крови, печени и мозга.** Экстракцию липидов из плазмы крови проводили по методу Блая и Дайера [23]; из тканей печени и головного мозга – по методу Фолча в модификации Кейтса [24].

**Определение антиокислительной активности плазмы крови, липидов печени и головного мозга мышей.** Измерения антиокислительных параметров проводили на хемилюминометре Minilum<sup>®</sup> L-100 компании Oxidaq UG Ltd. (Германия) с проточной, термостатированной при  $37 \pm 0.02^{\circ}C$  кюветой [25], методом термоиницированной хемилюминесценции с использованием китов ARA-W и ARA-L [26]. Определяли ACW (суммарную антиокислительную емкость водорастворимых соединений плазмы крови) и ACL (антиокислительную емкость жирорастворимых соединений в липидах). Принцип термоиницированной хемилюминесценции основан на регистрации хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей взаимодействие с люминолом свободных радикалов, возникающих при термоиницированном распаде водорастворимого азосоединения 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорида для ACW или жирорастворимого 2,2'-азо-бис(2,4-диметил-валеронитрила) для ACL в соответствии со схемой (рис. 1) [27–29]. С потенциальными антиоксидантами могут реагировать радикалы  $R^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$ ,  $L^{\bullet-}$ ,  $O_2^{\bullet-}$ , формирующиеся в реакциях, протекающих в процессе окисления.

При определении ACW плазмы крови мышей в реакционную кювету добавляли 50 мкл раствора 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорида, 50 мкл раствора люминола (кит ARA-W). Объем вводимой плазмы крови мышей составил 5–10 мкл, фосфатный буферный раствор

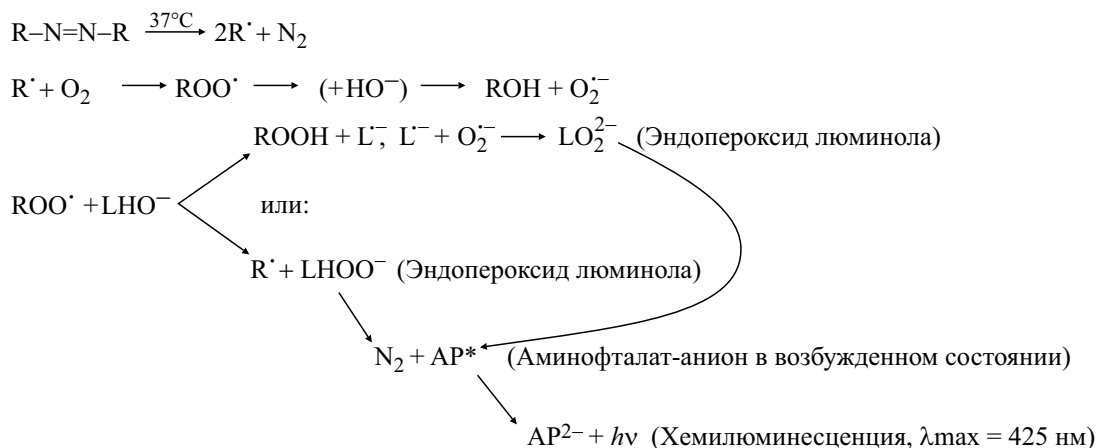


Рис. 1. Схема предполагаемых реакций в модели термоиницированной хемилюминесценции [27–29].

(рН 7.2) добавляли до конечного объема реакционной смеси (1.5 мл) [26]. Для каждой группы мышей проводили пять-шесть повторных регистраций. Измеряемым параметром являлся период индукции  $\tau$ , который определяли как время от момента инициирования окисления до точки пересечения с осью времени касательной, приложенной к ХЛ кривой в точке ее перегиба (рис. 2). Для калибровки в качестве эталона использовали аскорбиновую кислоту, АСВ выражали в эквивалентном содержании аскорбиновой кислоты в 1 мл плазмы крови (нмоль аскорбиновой кислоты/мл плазмы). На рис. 2 приведены характерные ХЛ-кривые для определения АСВ плазмы крови мышей.

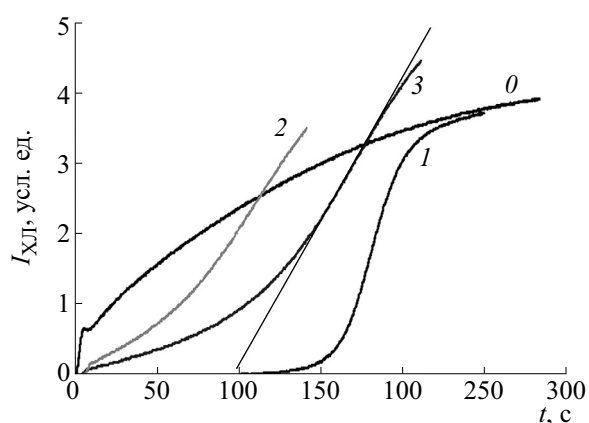


Рис. 2. Примеры характерных кинетических кривых интенсивности ХЛ (I) при измерении АСВ плазмы крови мышей: кривая 0 — холостая проба (без плазмы), 1 — аскорбиновая кислота, кривые 2 и 3 — плазма крови мышей (VIII и I гр.), прямая линия — касательная к кривой 3 в точке ее перегиба.

Надо отметить, что в отличие от ХЛ-кривой для аскорбиновой кислоты (рис. 2, кривая 1), для всех ХЛ-кривых плазмы крови характерно увеличение интенсивности ХЛ после периода индукции выше холостой пробы (кривая 0). Подобную картину для термоиницированной ХЛ плазмы и сыворотки крови наблюдали также и в других работах (например, [30, 31]). Это может быть связано с образованием в процессе окисления люминола промежуточных радикальных интермедиатов, меняющих кинетику окисления. Глутатион, а также некоторые другие тиольные соединения в белках плазмы крови, например цистеин, могут восстанавливать образующиеся при окислении гидропероксиды, и это восстановление может проходить через радикальные стадии (тиольные

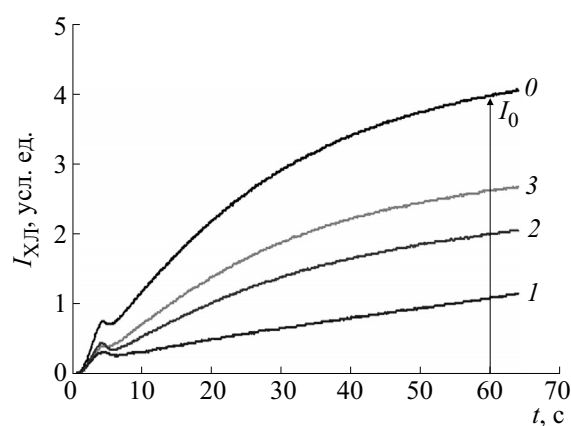


Рис. 3. Примеры характерных кинетических кривых ХЛ для определения АСЛ: 0 — холостая проба (бланк); кривые 1–3 — соответственно липиды плазмы крови, печени и мозга;  $I_0$  — интенсивность ХЛ на кривой (0) при  $t = 60$  с.

Суммарная антиокислительная активность водорастворимых компонентов плазмы крови

АСW, нмоль аскорбиновой кислоты/мл плазмы

I <sup>#</sup>	II	III <sup>#</sup>	IV	V	VI	VII	VIII
69.9 ± 3.8	27.8 ± 1.1	49.2 ± 5.5	22.0 ± 5.0*	23.8 ± 4.4*	24.2 ± 3.7*	36.6 ± 6.5	31.0 ± 5.2

Примечание. <sup>#</sup> – Плазма крови с гемолизатом; \* –  $p < 0.05$  по отношению к контрольной группе VIII.

соединения + гидропероксиды → TS<sup>•</sup> + LO<sup>•</sup> + H<sub>2</sub>O), образуя дополнительный источник радикалов [32, 33]. Возможно, некоторые интермедиаты плазмы крови выступают как активаторы люминесценции. Остатки гемоглобина эритроцитов в плазме крови могут проявлять радикалпродуцирующую активность по отношению к липидным и другим органическим гидропероксидам, присутствующим в плазме, инициируя образование липидных пероксильных радикалов [30].

Для определения АОА жирорастворимых соединений в липидах плазмы крови, печени и мозга (ACL) измеряли степень уменьшения ( $I/I_0$ ) амплитуды ХЛ ( $I$ ) в момент времени  $t = 60$  с от начала окисления по сравнению с амплитудой ХЛ для холостой пробы  $I_0$  (рис. 3). Объем реакционной смеси в кювете составил 1.5 мл, включая объем добавляемых липидов (50–100 мкл), 25 мкл раствора 2,2'-азо-бис(2,4-диметил-валеронитрила) и 125 мкл раствора люминола (киты ARA-L), остальное – метанол [26]. Число повторов равнялось четырем-пяти. Калибровку для ACL проводили по тролоксу и выражали в эквивалентном содержании тролокса в мг липидов (нмоль тролокса/мг липидов).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с использованием компьютерных программ Origin Pro 8.1 и Microsoft<sup>®</sup> Office Excel. Результаты исследования представлены как средняя измеряемая величина ± стандартная ошибка средней. Для сравнения данных использовались методы непараметрической статистики с критерием Манна–Уитни. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как указывалось выше, устойчивость организма к повреждающим воздействиям и развитию патологий многие авторы связывают с уровнем суммарной антиоксидантной активности их орга-

нов [1–7, 30, 34, 35]. При этом делаются попытки использовать метод хемилюминесценции в клинике для целей диагностики и контроля над терапией заболеваний [29, 30], причем в одних работах предпочтение отдается водорастворимым антиоксидантам [29–31], а в других – жирорастворимым [1, 2]. Мы использовали в наших экспериментах киты ARA-W и ARA-L, позволяющие оценить АОА и водо- и жирорастворимых веществ в плазме крови экспериментальных животных.

В таблице представлены результаты измерения суммарной АОА водорастворимых компонентов плазмы крови (АСW) для восьми групп исследованных животных, выраженные в единицах, эквивалентных количеству аскорбиновой кислоты.

Как видно из таблицы, уровень АОА плазмы крови мышей групп I и III значительно выше остальных. Следует отметить, что в этих образцах визуально был замечен гемолизат эритроцитов. В процессе гемолиза в плазму крови попадают элементы эритроцитов: метгемоглобинредуктаза, супероксиддисмутаза и ферменты глутатионового цикла [36], которые, как было показано в работах [36, 37], эффективно увеличивают период индукции на кривых хемилюминесценции. Поэтому высокий уровень АСW в плазме крови мышей I и III групп можно объяснить именно гемолизом. К сожалению, наличие гемолиза не позволяет провести сравнение уровней АСW в плазме крови исходных контрольных животных и мышей группы VIII (контроль через 92 суток после начала эксперимента). Рассматривая результаты, полученные для АСW остальных групп животных, можно сказать, что по сравнению с группой VIII, являющейся контролем, наблюдается статистически достоверное снижение АСW плазмы у мышей групп IV, V и VI, которые принимали липосомы, изготовленные из ФХ + Каз-Na, ФХ + ЭМГ + Каз-Na и ФХ + РЖ + Каз-Na соответственно. Значение АСW плазмы крови у мышей группы VII находится на уровне контроля, но статистиче-

ски достоверно превышает АСВ плазмы крови мышей групп II, IV, V и VI.

Таким образом, можно сделать вывод, что применение всех используемых диет или не влияло на уровень АОА водорастворимых антиоксидантов плазмы крови (группа VII), или даже снижало его (группы IV и VI).

Рассмотрим теперь, какие изменения под влиянием различных диет произошли в АОА жирорастворимых антиоксидантов (АСЛ) плазмы крови мышей. Эти результаты приведены на рис. 4а.

Видно, что у контрольных мышей, содержащихся на общевиварном рационе, АСЛ плазмы крови уменьшилась за три месяца проведения эксперимента более чем в шесть раз (группы I и VIII). Это объясняется старением животных и снижением уровня АСЛ [38, 39]. Все используемые водорастворимые наноконтакты увеличивали АСЛ липидов плазмы крови мышей по сравнению с соответствующим контролем (группа VIII). Это связано, как и предполагалось, с наличием в наноконтактах жирорастворимых антиоксидантов, накапливающихся при постоянном приеме в липидах плазмы крови. Наибольший эффект наблюдался у животных группы II, для которых уровень АСЛ статистически достоверно не отличался от уровня у контрольных молодых мышей. Вероятно, это связано с накоплением в липидах плазмы крови альфа-токоферола, небольшое количество которого содержалось в ФХ, использованном для приготовления исходных липосом. Не исключено, что усвоение альфа-токоферола из плазмы крови органами животных группы II идет медленнее, чем у мышей, принимающих более сложные наноконтакты, созданные на основе того же ФХ. Сравнивая между собой эффективность других наноконтактов, можно отметить, что на фоне всех остальных выделяются по степени увеличения (в полтора-два раза) АСЛ группы V (ФХ:ЭМГ:Каз-На=1:0,02:10) и группы VII (ФХ:РЖ:ЭМГ:Каз-На = 1:1:0,02:20) с диетой, содержащей ЭМГ и Каз-На. АСЛ плазмы крови мышей группы VII, отличавшейся от группы V дополнительным приемом рыбьего жира, была выше, что, вероятно, объясняется наличием в рыбьем жире некоторых жирорастворимых антиоксидантов. Сопоставляя влияние используемых диет на АОА водо- и жирорастворимых антиоксидантов плазмы крови, можно сделать заключение о их противоположном действии: эффективность водорастворимых антиоксидантов снижается или не изменяется, в то время как АОА липидной компоненты возрастает.

Изменения АСЛ липидов печени мышей, приведенные на рис. 4б, свидетельствуют о тенден-

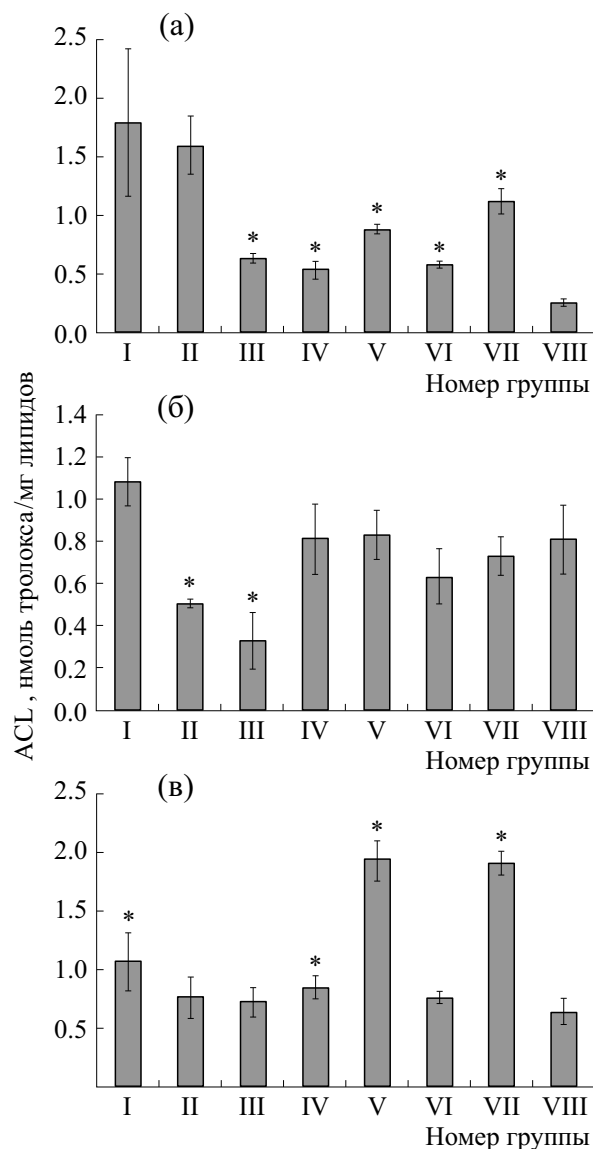


Рис. 4. Сравнительные диаграммы суммарной АОА жирорастворимых компонентов (АСЛ) плазмы крови (а), печени (б) и мозга (в); \* –  $p < 0.05$  по отношению к контрольной группе VIII.

ции к снижению АСЛ у возрастных животных (группа VIII), достоверном уменьшении АСЛ в группах II (ФХ) и III (ФХ:ЭМГ = 1:0,02) и сохранении того же уровня АСЛ, что и в контроле (группа VIII), в группах с IV по VII. По-видимому, уменьшение уровня АОА липидов в группах II и III можно связать с конкурентными взаимодействиями введенных с диетой экзогенных антиоксидантов и эндогенных антиоксидантов, содержание которых в печени достаточно высокое [1, 2, 38, 39]. Ранее нами было установлено, что хроническое введение антиоксидантов иногда может приводить к снижению АОА именно в печени [1, 2, 40]. Эвгенол, входящий в состав ЭМГ, в высо-

ких концентрациях также может выступать как прооксидант и инициатор перекисного окисления липидов [41, 42].

Для липидов мозга видно (рис. 4в), что, как и в плазме крови, АСЛ у контрольных мышей группы VIII достоверно снижена по сравнению с группой I, хотя и не столь значительно (примерно в полтора раза), что также можно объяснить возрастными изменениями [38, 39]. Действие всех наноконплексов приводило к увеличению АСЛ по отношению к контролю (группа VIII). Если для групп II (ФХ), III (ФХ+ЭМГ) и VI (ФХ+РЖ+Каз-На) это было только тенденцией, то в группах IV (ФХ+Каз-На), V (ФХ:ЭМГ:Каз-На=1:0,02:10) и VII (ФХ:РЖ:ЭМГ:Каз-На = 1:1:0,02:20) наблюдалось статистически достоверное увеличение данного параметра; при этом значения АСЛ у мышей групп V и VII в два-три раза превышали уровень АСЛ в остальных группах животных.

Сопоставляя влияние различных липосомных наноконплексов на АОА липидов различных органов экспериментальных животных (плазма крови, печень и головной мозг), можно отметить следующие закономерности: в течение 92 суток проведения эксперимента АОА липидов всех исследуемых органов животных, содержащихся на общевиварном рационе (группы I и VIII), уменьшалась, хотя и в различной степени, а наибольшие изменения происходили в липидах плазмы крови. Это уменьшение можно объяснить возрастными изменениями [38, 39]. Использование в диетах мышей липосомных комплексов приводило к увеличению АОА липидов плазмы крови и головного мозга, приближая эту величину к уровню, характерному для молодых особей (группа I), или даже превышая его (головной мозг мышей групп V и VII). Это, безусловно, является положительным моментом, так как связано с повышением устойчивости данного органа к повреждающим воздействиям. Следует отметить, что ранее аналогичные качественные данные были получены в работе [19] при шестимесячном введении мышам ЭМГ в виде водной взвеси. Однако в наших экспериментах получился больший эффект, особенно при использовании диет, в которых наряду с антиоксидантами ( $\alpha$ -токоферолом и ЭМГ) содержался Каз-На (группы IV, V и VII). В случае же групп V и VII можно предположить, что это увеличение объясняется накоплением как в мозге, так и в плазме крови мышей жирорастворимого антиоксиданта, коим является эвгенол из гвоздичного масла [41–43]. В липосомной диете, содержащей рыбий жир, из него, кроме омега-3 и других жирных кислот, в клетки мозга попадает еще один антиоксидант, а именно жирорастворимый витамин А. Омега-3 в сочетании с  $\alpha$ -токоферолом могут «включать» также клеточные сигнальные пути, ведущие к увеличению активности антиоксидантных ферментов [44]. Использование в диете водорастворимых липосомных нано-

комплексов, состоящих из липосом ФХ с ЭМГ, покрытых белковой оболочкой, способствует, по-видимому, лучшей доставке антиоксидантов из липосом в клетки мозга и препятствует их расходу в процессах перекисного окисления липидов. При использовании липосом, состоящих из одного ФХ (группа II), мы наблюдали значительное увеличение АОА плазмы крови при отсутствии изменений в головном мозге. Данное различие можно объяснить незначительным включением этих липосом в липиды мозга, но заметным накоплением в плазме крови. Переход к более сложным диетам, содержащим, наряду с ФХ, ЭМГ и Каз-На (группы V и VII), приводит к увеличению и АОА липидов плазмы крови, и АОА головного мозга. Это хорошо коррелирует с нашими данными, полученными при окислении этих липосом *in vitro*: именно сочетание ЭМГ и Каз-На вызывало синергетическое увеличение периода индукции на кривых окисления [43]. Возможно, что в головном мозге мышей групп V и VII работают оба фактора – облегчение транспорта липосом с антиоксидантами и синергизм в действии ЭМГ и Каз-На.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе методом термоиницированной хемилюминесценции было проведено исследование изменения антиокислительной активности водорастворимых и липидных компонентов плазмы крови мышей, а также АОА липидов их печени и мозга в зависимости от состава водорастворимых липосомных наноконплексов, включенных в комплексную диету мышей на протяжении 92 суток.

По результатам можно сделать вывод, что диета мышей с водорастворимой добавкой инкапсулированных Каз-На липосом из соевого ФХ с добавлением в них рыбьего жира и включением ЭМГ оказалась самой эффективной в отношении АСЛ плазмы крови, а также значительно увеличивала АОА липидов мозга мышей по сравнению с контролем. Это дает основание рекомендовать такие липосомные наноконплексы в качестве функциональных добавок для практического использования.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят д-ра И.Н. Попова (НИИ антиокислительной терапии, Берлин, Германия) за научно-техническую поддержку этой работы, выполненной в рамках договора о сотрудничестве между ИБХФ РАН и НИИ АТ, и критическое прочтение рукописи. Мы благодарим также компанию Oxidaq UG Ltd (Берлин, Германия) за

предоставление нам прибора Minilum® и необходимых реактивов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. Б. Бурлакова, А. В. Алесенко, Е. М. Молочкина и др., *Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте* (Наука, М., 1975).
2. Е. Б. Бурлакова и Н. П. Пальмина, *Вопр. онкологии* **36** (10), 1155 (1990).
3. Е. Б. Бурлакова, *Успехи химии* **44** (10), 1871 (1975).
4. Е. Б. Бурлакова, Г. Ф. Иваненко и Л. Н. Шишкина, *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, № 4, 588 (1985).
5. I. Popov, G. Lewin, G. Matthes, et al., *Z. Klin. Med.* **43**, 1663 (1988).
6. I. Popov, M. Popov, and G. Lewin, in *Free Radicals and Oxidative Stress: Chemistry, biochemistry and pathophysiological implications*, Ed. by D. Galaris (Medimond, Ioannina, 2003), pp. 219–223.
7. И. Н. Попов и Г. Левин, *Биофизика* **58** (5), 848 (2013).
8. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, *Успехи химии* **54** (9), 907 (1985).
9. Е. Б. Бурлакова, С. А. Крашаков и Н. Г. Храпова, *Биол. мембраны* **15** (2), 161 (1998).
10. S. Dhavamani, Y. P. C. Rao, and B. R. Lokesh, *Food Chem.* **164**, 551 (2014).
11. R. K. Saini and Y.-S. Keum, *Life Sci.* **203**, 255 (2018).
12. N. R. Fuentes, E. Kima, Y.-Y. Fana, and R. S. Charkina, *Mol. Aspects of Medicine* **64**, 79 (2018).
13. R. J. T. Mocking, J. Assies, H. G. Ruhé, and A. H. Schene, *J. Inherited Metab. Dis.* **41**, 597 (2018).
14. M. Simonetto, M. Infante, R. L. Sacco, et al., *Nutrients* **11**, 2279 (2019).
15. G. C. Candela, L. L. M. Bermejo, and K. V. Loria, *Nutric. Hospital* **26** (2), 323 (2011).
16. М. Г. Семёнова, А. С. Антипова, Н. П. Пальмина и др., *Хим. физика* **38** (12), 38 (2019).
17. M. G. Semenova, A. S. Antipova, D. V. Zelikina, et al., *Food Res. Intern.* **88**, 70 (2016).
18. R. S. Jope, D. J. Jenden, C. S. Subramanian, et al., *Biochem. Pharmacol.* **33** (5), 793 (1984).
19. T. A. Misharina, L. D. Fatkullina, E. S. Alinkina, et al., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **50** (1), 101 (2014).
20. K. J. Valentini, C. A. Pickens, J. A. Wiesinger, and J. I. Fenton, *Int. J. Food Sci. Nutrition* **69** (6), 705 (2018).
21. A. Balcerezyk, A. Gajewska, E. Macierzynska-Piotrowska, et al., *Molecules* **19**, 14794 (2014).
22. S. S. Teh, S. H. Mah, S. W. Gouk, et al., *J. Food Nutr. Res.* **6** (1), 39 (2018).
23. T. G. Blaign and W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
24. М. Кейтс, *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов* (Мир, М., 1975).
25. <http://www.minilum.de>.
26. I. Popov and G. Lewin, *LABO* **11**, 8 (1997).
27. I. Popov and G. Lewin, *Luminescence* **20**, 321 (2005).
28. I. Popov and G. Lewin, in *Handbook of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment*, Ed. by I. Popov and G. Lewin (Transworld Research Network, Kerala, 2008), pp. 361–391.
29. Н. Н. Сажина, И. Н. Попов и В. Н. Титов, *Клин. лабор. диагн.* **63** (1), 16 (2018).
30. М. М. Созарукова, А. М. Полимova, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, *Биофизика* **61** (2), 337 (2016).
31. Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова и А. Н. Осипов, *Биофизика* **64** (5), 883 (2019).
32. M. L. Sagristá, A. E. García, M. A. De Madariaga, and M. Mora, *Free Radic. Res.* **36** (3), 329 (2002).
33. Е. А. Менгеле, Д. А. Круговов и О. Т. Касаикина, *Изв. РАН. Сер. хим.* **4** (1), 1 (2015).
34. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
35. Ю. А. Владимиров, *Соросовский образоват. журн.* **7** (1), 16 (2001).
36. R. V. Hebbel and J. Lab. *Clin. Med.* **107**, 401 (1986).
37. G. Lewin and I. Popov, *Med. Hypoth.* **42**, 269 (1994).
38. Е. Б. Бурлакова, Е. М. Молочкина, Н. П. Пальмина и Л. В. Слепухина, *Вопр. мед. химии* **22** (4), 541 (1976).
39. Н. П. Пальмина, Л. К. Обухова и Т. В. Бунто, *Изв. АН СССР. Сер. биол.* **2**, 290 (1979).
40. Е. Б. Бурлакова, Н. М. Дзюба и Н. П. Пальмина, *Биофизика* **1** (5), 766 (1965).
41. T. Atsumi, S. Fujisawa, and K. Tonosaki, *Toxicol. In Vitro* **19**, 1025 (2005).
42. D. P. Bezerra, G. C. G. Militão, M. Castro de Moraes and D. Pergentino de Sousa, *Nutrients* **9**, 1367 (2017).
43. N. N. Sazhina, A. S. Antipova, M. G. Semenova, and N. P. Palmira, *Russ. J. Bioorgan. Chem.* **45** (1), 34 (2019).
44. R. Rodrigo, J. C. Prieto, and R. Castillo, *Clin. Sci.* **124**, 1 (2013).



## **The Influence of Liposomal Nanocomplex Composition on Antioxidant Activity of Mice Blood Plasma, Liver and Brain Lipids**

**N.N. Sazhina, M.G. Semenova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, and N.P. Palma**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygina str. 4, Moscow, 119334 Russia*

Much attention is currently given to research and development of the efficient systems for the delivery of essential omega-3-polyunsaturated fatty acids and other nutraceuticals to the human body through food. Nanocomplexes, which are based on soybean phosphatidylcholine liposomes with nutraceuticals included are amongst the efficient delivery systems. The prolonged use of these nanocomplexes may affect the antioxidant status in various organs and tissues. In this work, a thermo-initiated chemiluminescence method was used to study changes in the antioxidant activity of blood plasma, liver and brain lipids in mice divided into six groups depending on the composition of liposomal nanocomplexes introduced into drinks substituted for water in a long-term (3 months) diet. The components of six types of liposomal nanocomplexes, except for phosphatidylcholine, in different combinations were: clove essential oil, fish oil and sodium caseinate. The results of the study showed that nanocomplexes containing liposomes from phosphatidylcholine with the addition of fish oil, clove essential oil and treated with milk protein (sodium caseinate) for food encapsulation purposes proved to be the most effective in increasing the antioxidant activity in blood plasma and brain lipids in mice as compared to control.

*Keywords: functional nutraceuticals, liposomes, clove essential oil, fish oil, sodium caseinate, antioxidant, antioxidant activity, chemiluminescence*