

УДК 615.451.232

## ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ С КАРНОЗИНОМ И ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ: ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА

© 2016 г. В.А. Щелконогов\*, \*\*, \*\*\*, Е.С. Дарнотук\*, А.В. Чеканов\*\*, \*\*\*, О.А. Баранова\*\*, \*\*\*, К.Д. Казаринов\*\*\*, Н.С. Шастина\*, С.Л. Стволинский\*\*\*\*, Т.Н. Федорова\*\*\*\*,

Э.Ю. Соловьева\*\*, А.И. Федин\*\*, **Г.М. Сорокоумова\***

\*МИРЭА – Российский технологический университет, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

E-mail: vasily9999@yandex.ru

\*\*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

\*\*\*Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова РАН, 141190, Фрязино Московской области, пл. Введенского, 1

\*\*\*\*Научный центр неврологии, Москва, 125367, Волоколамское шоссе, 80

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

Подобраны условия для получения фосфатидилхолиновых липосом, содержащих одновременно липоевую кислоту и карнозин. Полученные липосомы представляют собой сферические частицы размером 180–250 нм, характеризующиеся эффективностью включения липоевой кислоты, равной 50–70%, и карнозина – 17–33%. На модели окисления фосфатидилхолина пероксидом водорода показано антиоксидантное действие карнозина, липоевой кислоты или липоевой кислоты с карнозином совместно, заключающееся в торможении процесса липидной пероксидации, которое проявляется в уменьшении образования продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Установлено, что липоевая кислота (5 мМ) и карнозин (0.1–10 мМ) в липосомах проявляют антиоксидантное действие. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной пероксидации в липосомах с антиоксидантами (липоевая кислота + карнозин) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов). Оценено влияние полученных липосомальных препаратов на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой. Обнаружено, что липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляет агрегацию тромбоцитов на 50–55% относительно контроля (тромбоциты и арахидоновая кислота), в то время как липосомы без антиоксидантов и водорастворимые формы препаратов карнозина и липоевой кислоты практически не влияют на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой кислотой.

*Ключевые слова:* липосомы, карнозин, липоевая кислота, ТБК-активные продукты, арахидоновая кислота.

DOI: 10.31857/S0006302921020149

Цереброваскулярные заболевания занимают второе место среди всех причин инвалидизации и смертности населения во всем мире, уступая сердечно-сосудистым патологиям и опережая онкологические заболевания. Нарушение кровоснабжения головного мозга является пусковым механизмом развития комплекса патобиохимических реакций, приводящих к дегенерации и гибели

нейронов. Наиболее значимыми являются нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, воспалительные процессы, аутофагия и деструкция гематоэнцефалического барьера, что сопровождается очаговым повреждением ткани мозга в области ишемии [1]. При этом окислительный стресс является основным молекулярным механизмом, лежащим в основе гибели ткани мозга и развития неврологического дефицита.

*Сокращения:* ЛК – липоевая кислота, АК – арахидоновая кислота, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, ФХ – фосфатидилхолин, ЭВ – эффективность включения, ТБК-АП – тиобарбитурат-активные продукты.

Патогенетическая значимость окислительного стресса при развитии ишемического поражения мозга обуславливает целесообразность применения нейропротекторных препаратов антиоксидантного действия [2]. Среди низкомолекулярных антиоксидантов представляют интерес липоевая кислота (ЛК) и карнозин.

ЛК способна перехватывать активные формы кислорода и восстанавливать эндогенные антиоксиданты – глутатион, витамины Е и С. Благодаря такому сочетанию свойств ее рассматривают как перспективный терапевтический препарат [3, 4]. На экспериментальных моделях ишемии у крыс и мышей было выявлено нейропротекторное действие ЛК, проявившееся в улучшении неврологических функций, уменьшении площади очага ишемического повреждения, обусловленного подавлением окислительного стресса и каспазо-зависимых процессов апоптоза [5, 6].

В медицинской практике препараты ЛК применяются при диабетической полинейропатии, интоксикации тяжелыми металлами, при циррозах печени. Имеются сведения об эффективности применения ЛК при комплексной терапии хронической ишемии головного мозга в третьей стадии заболевания, в том числе с последствиями ишемического инсульта [7, 8].

Существенным недостатком ЛК является ее очень низкая растворимость в воде, быстрое связывание с различными белками и быстрая биодegradация под действием различных ферментов [9], что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. Полная деградация в кровотоке происходит менее чем за час. В результате для достижения терапевтического эффекта препараты, содержащие ЛК, вводят в больших дозах и в течение длительного времени.

Другим эффективным антиоксидантом является карнозин –  $\beta$ -аланил-*L*-гистидин. Карнозин содержится в больших количествах в мышечной и нервной ткани. Он обладает не только свойствами прямого антиоксиданта-перехватчика радикалов, но является и антигликирующим агентом, хелатором ионов металлов, молекулярным шапероном и индуктором антиоксидантных систем в условиях окислительного стресса [10]. На различных моделях ишемии головного мозга было показано, что карнозин проявляет прямое нейропротекторное действие, ограничивая размеры формирующегося очага некроза, предотвращает развитие неврологической симптоматики, снижает смертность животных. Ключевые молекулярные механизмы нейропротекторного действия карнозина обусловлены его способностью уменьшать эксайтотоксичность глутамата, препятствовать развитию окислительного стресса, изменению соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, в особенности Bax

и Bcl-2, а также уменьшению активации киназы Akt, регулирующей соотношение и активность данных белков [11–14].

Нейропротекторное действие карнозина, показанное на различных моделях глобальной и фокальной ишемии головного мозга, открывает перспективу для создания лекарственных препаратов на его основе [15].

В пилотном исследовании, выполненном двойным слепым плацебо-контролируемым методом, было показано, что включение карнозина в схему лечения пациентов с хронической ишемией мозга оказывает стабилизирующее действие на форменные элементы крови, усиливает эндогенную антиоксидантную систему организма на фоне улучшения когнитивных функций мозга у пациентов [16].

Однако эффективность действия карнозина в организме ограничена низкой липофильностью, а также его гидролизом, катализируемым карнозиной [17]. Повысить эффективность карнозина можно путем синтеза его производных [18] или включив его в наноструктурные конструкции [19].

Одним из основных звеньев гемостатической активации, сопровождающей острые нарушения мозгового кровообращения, является уменьшение атромбогенных свойств эндотелия сосудистой стенки. У пациентов с ишемическим инсультом выявляется нарушение антиагрегационной, антикоагулянтной и фибринолитической активности сосудистой стенки, максимально выраженные в острейшем периоде ишемического инсульта [20, 21]. В настоящее время антиагрегантная терапия является ключевым фармакологическим подходом к профилактике и лечению острого ишемического инсульта [22].

В экспериментах *in vitro* было показано, что ЛК подавляет агрегацию тромбоцитов, снижает уровень кальция и тромбосана В2 при активации их коллагеном и арахидоновой кислотой (АК) [23]. Также было обнаружено, что липосомальная форма ЛК способна эффективно подавлять агрегацию тромбоцитов, обусловленную АК [24]. Антиагрегантное действие карнозина было описано в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [25].

Совокупность свойств, присущих ЛК и карнозину, делает актуальной задачу создания новых лекарственных форм на основе этих соединений. Одним из подходов к решению этой проблемы является создание препарата, содержащего ЛК и карнозин, путем включения их в липосомы. Способность липосом проникать через гематоэнцефалический барьер имеет важное значение для доставки этих препаратов в мозг [26].

Целью данной работы является получение новой липосомальной формы, включающей карно-

зин и ЛК, и исследование ее физико-химических свойств с оценкой влияния на функциональную активность тромбоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 (Lipoid GmbH, Германия) 94%-й чистоты, выделенный из бобов сои; карнозин, липоевую кислоту, дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), холестерин, фосфатно-солевой буферный раствор (Sigma-Aldrich, США); арахидоновую кислоту (Helena Biosciences, США); хлороформ, физиологический раствор (0.9% NaCl), этиловый спирт, сульфат аммония («Химмед», Россия). Для проведения диазореакции использовали следующие вещества: сульфаниловую кислоту, соляную кислоту, нитрит натрия, карбонат натрия, дезоксихолат натрия («Химмед», Россия).

**Получение липосом методом пассивной загрузки.** 1. *Фосфатидилхолиновые липосомы.* Раствор фосфатидилхолина (ФХ, 40 мг/мл) в хлороформе (1 мл) упаривали при температуре 40°C. Для приготовления суспензии липосом с концентрацией ФХ (40 мг/мл) полученную липидную пленку диспергировали 0.9% физиологическим раствором (рН 5.7, 1 мл) или 0.3 М буферным раствором сульфата аммония (рН 7.4, 1 мл). Полученную суспензию подвергали пятикратному циклу замораживания и оттаивания. Одноламеллярные везикулы получали методом экструзии с помощью миниэкструдера LiposoFast basic (Avestin, США) при многократном пропуске полученной дисперсии (50 раз) через ядерный поликарбонатный фильтр Whatman (США) с размером пор 100 и 200 нм.

2. *Липосомы, содержащие липоевую кислоту,* получали аналогично методике 1): упариванием раствора ЛК (5 мг/мл) и ДПФХ (40 мг/мл) или ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе (1 мл). Для приготовления суспензии липосом, содержащих ЛК, полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора (рН 5.7) или 1 мл 0.3 М буферного раствора сульфата аммония (с сахарозой или без нее, рН 7.4). При использовании ДПФХ полученную суспензию нагревали до 40°C с последующей экструзией.

3. *Липосомы, содержащие карнозин,* получали аналогично методике а): упариванием раствора ФХ (40 мг/мл) или ФХ (28 мг/мл) и холестерина (12 мг/мл) в хлороформе (1 мл). Для приготовления суспензии липосом, содержащих карнозин (20 мг/мл), полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора с карнозином (рН 8.2) с последующей экструзией полученных дисперсий.

4. *Липосомы, содержащие липоевую кислоту с карнозином,* получали аналогично методике 1): упариванием раствора ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе. Для приготовления суспензии липосом, содержащих ЛК (5 мг/мл) и карнозин (20 мг/мл), полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.9% физиологического раствора с карнозином (рН 7.4) с последующей экструзией полученной дисперсии.

Отделение одноламеллярных везикул с включенными в них субстанциями от свободных препаратов проводили методом гель-хроматографии на колонке illustra NAP-5 с сорбентом Sephadex G25 Medium (Великобритания). Содержание инкапсулированных препаратов определяли после разрушения липосом этанолом: ЛК – спектрофотометрическим методом [24], карнозин – по диазореакции [27].

**Получение липосом методом активной загрузки.** Раствор ЛК (5 мг/мл) и ФХ (40 мг/мл) в хлороформе (1 мл) упаривали при температуре 40°C. Для приготовления суспензии липосом полученную липидную пленку диспергировали в 1 мл 0.3 М буферного раствора сульфата аммония (с сахарозой или без нее, рН 7.4) с последующей экструзией полученной дисперсии. Затем липосомы отделяли от сульфата аммония методом гель-фильтрации, к липосомам (0.75 мл) добавляли водный раствор карнозина (20 мг/мл, 0.25 мл) при нагревании при 60°C и перемешивали в течение 30 мин. Степень включения ЛК в липосомы определяли спектрофотометрическим методом, содержание карнозина – с помощью диазореакции. Размер полученных липосом определяли методом динамического светорассеяния на приборе Delsa Nano C (Beckman Coulter Inc., США).

**Реакция карнозина с диазореактивом.** Раствор сульфаниловой кислоты (0.5 мМ, 6 мл) и свежеприготовленный раствор нитрита натрия (0.6 М, 6 мл) перемешивали в течение 5 мин при охлаждении на ледяной бане. Затем прибавляли еще 24 мл раствора нитрита натрия, перемешивали в течение 5 мин, доливали дистиллированную воду до 100 мл. Далее строили калибровочный график зависимости концентрации карнозина от оптической плотности. Для этого отбирали различные аликвоты стандартного раствора карнозина (1 мМ: 12, 24 и 48 мкл и 10 мМ: 12 и 24 мкл) и доводили дистиллированной водой до 1 мл. Потом добавляли диазореактив (1.5 мл), перемешивали и оставляли на 5 мин, добавляли раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.9 М, 1.5 мл) и перемешивали, через 10 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре UV-1601 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 400 до 550 нм.

Одноламеллярные везикулы пропускали через эксклюзионную колонку для разделения липосом с карнозином от свободного карнозина, от-

бирали фракции и проводили диазореакцию. Для этого из полученных фракций отбирали в пробирку по 75 или 25 мкл образца (при этом фракцию с липосомами разрушали детергентом дезоксихолатом натрия (0.1 М, 1 мл)), добавляли дистиллированную воду до 1 мл. Затем добавляли диазореактив (1.5 мл), перемешивали и оставляли на 5 мин. Далее добавляли раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.9 М, 1.5 мл) и перемешивали. Через 10 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре в диапазоне длин волн от 400 до 550 нм.

К фосфатидилхолиновым липосомам, содержащим карнозин, ЛК, или ЛК (5 мМ) с карнозином в различных концентрациях (0.1 М–10 мМ), добавляли  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 мМ), затем инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин и определяли содержание продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов, ТБК-АП). В качестве контролей использовали липосомы из ФХ, не содержащие данных антиоксидантов (в отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также в его присутствии до и после инкубации).

**Определение ТБК-активных продуктов [28].** Использовали свежеприготовленный реагент, который получали путем растворения трихлоруксусной кислоты (0.9 М) и тиобарбитуровой кислоты (4.6 мМ) в дистиллированной воде при нагревании (50°C) на водяной бане. К 0.5 мл анализируемого образца липосом добавляли 3 мл указанного выше реагента и кипятили в течение 30 мин. Затем реакционную смесь охлаждали, добавляли 1 мл хлороформа, встряхивали и центрифугировали в течение 20 мин при 540 g при комнатной температуре на центрифуге СМ-6МТ (ELMI, Латвия). Измеряли оптическую плотность раствора в верхней водной фазе относительно реагента при 580 и 532 нм и рассчитывали концентрацию ТБК-активных продуктов (в нмоль/мл) в образце по формуле:

$$C_{\text{ТБК-АП}} = \frac{(OD_{532} - OD_{580}) \times 6 \times 1000}{155}.$$

(Коэффициент экстинкции малонового альдегида при 532 нм –  $155 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ; коэффициент разведения липосом в реакционной среде – 6).

**Подготовка образцов крови для исследования процесса агрегации тромбоцитов.** Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, взятых у здоровых доноров мужского пола в возрасте 20–25 лет ( $n = 15$ ). Для забора венозной крови использовали стандартные пробирки Improvacuter® с антикоагулянтом (цитрат натрия, 3.8%). Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови в течение 10 мин при 135 g при комнатной температуре.

**Исследование процесса агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой.** В образцы с обогащенной тромбоцитами плазмой

( $1 \cdot 10^6$  кл./мл, 225 мкл) добавляли липосомы без антиоксидантов, или комбинированный липосомальный препарат (ЛК и карнозин), или липосомы с ЛК или с карнозином, или их водорастворимые формы (растворы ЛК и карнозина в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7.4, 20 мкл), инкубировали в течение 5 мин при температуре, равной 37°C. Затем добавляли индуктор агрегации тромбоцитов – арахидоновую кислоту (1 мг/мл, 25 мкл). Агрегатограмму регистрировали на четырехканальном агрегометре Helena AggRAM (Helena Biosciences, США) в течение 10 мин.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Corporation, США). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовали статистический критерий Краскелла–Уоллиса ANOVA. Достоверными считались различия при  $p < 0.05$ . Результаты в табл. 1–3 и на рис. 1 и 2 представлены в виде средней величины и стандартной ошибки среднего значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЛК хорошо растворима в органических растворителях и щелочных растворах и мало растворима в воде, тогда как карнозин хорошо растворим в воде при разных значениях pH.

На первом этапе работы подбирали оптимальные условия для максимально возможного включения карнозина и ЛК в липосомы, в том числе путем подбора метода загрузки и липидного состава липосом.

Одноламеллярные везикулы, содержащие карнозин, получали методом пассивной загрузки, диспергируя высушенную липидную пленку водным раствором карнозина (20 мг/мл, pH 8.2) с последующей экструзией.

В результате проведенных исследований было установлено, что степень включения карнозина в липосомы из ФХ составила 28%, что на 10% больше, чем для образцов липосом, состоящих из ФХ и холестерина (табл. 1). При этом размер полученных наночастиц был одинаков и составил 235 нм, что позволяет судить о том, что липидный состав не влиял на размер получаемых липосом. Такое небольшое включение карнозина в липосомы можно объяснить, вероятно, быстрым выходом карнозина из водного пространства липосом при проведении гель-хроматографии. Поэтому при получении комплексного липосомального препарата, содержащего карнозин и ЛК, использовали активную загрузку карнозина в липосомы.

На следующем этапе работы получали липосомы с ЛК. Мультиламеллярные везикулы получа-

**Таблица 1.** Липосомальный препарат, содержащий карнозин

Состав липосом (40 мг/мл)	Карнозин, мг/мл	pH среды	ЭВ, %	Размер частиц, нм
ФХ	20	8.2	28 ± 7	235 ± 5
ХС/ФХ (1/1)	20	8.2	18 ± 5	235 ± 5

Примечание. Карнозин – исходная концентрация карнозина для получения липосом; ЭВ – эффективность включения карнозина в липосомы – отношение массы карнозина, включенного в липосомы, к исходной массе карнозина, которую брали для получения липосом; ХС/ФХ – молярное отношение холестерина к фосфатидилхолину.

**Таблица 2.** Липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту

Состав липосом (40 мг/мл)	ЛК, мг/мл	pH среды	ЭВ, %	Размер частиц, нм
ФХ	5	5.7	52 ± 10	245 ± 5
ФХ/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	7.4	70 ± 10	245 ± 5
ФХ/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /сахароза	5	7.4	33 ± 10	219 ± 5
ДПФХ	5	6.3	44 ± 10	210 ± 5

Примечание. ЛК – исходная концентрация липоевой кислоты для получения липосом; ЭВ – эффективность включения ЛК в липосомы – отношение массы ЛК, включенной в липосомы, к исходной массе ЛК, которую брали для получения липосом.

ли путем диспергирования высушенной липидной пленки буферными растворами (pH 5.7–7.4). Одноламеллярные везикулы получали из мультламеллярных везикул путем экструзии через ядерный поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100–200 нм. Таким образом, были получены липосомы с ЛК, характеристики которых представлены в табл. 2.

Анализ полученных результатов показал, что в зависимости от липидного состава и pH среды образовывались наночастицы с различной эффективностью включения (ЭВ) ЛК в липосомы. Максимальная степень включения ЛК в липосомы наблюдалась при использовании ФХ и буферного раствора сульфата аммония (pH 7.4, ЭВ составила 70%). Также можно предположить, что в данном препарате часть ЛК распределена в водной фазе, а часть – в липидном бислое, что хорошо коррелирует с амфифильными свойствами ЛК. При использовании ДПФХ (pH 6.3) и добавлении сахарозы для получения липосом с ЛК происходило значительное уменьшение степени включения ЛК в наночастицы. Размер полученных наночастиц колебался в диапазоне 210–250 нм.

В продолжение работы получали липосомы с совместным включением ЛК и карнозина в наночастицы, используя метод пассивной и активной загрузки. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 3.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при совместном включении ЛК и карнозина в липосомы из ФХ методом пассивной загрузки происходило уменьшение степени включения в липосомы как карнозина (ЭВ = 12%), так и ЛК (ЭВ = 50%). Однако получение липосом с ЛК и карнозином методом активной загрузки привело к увеличению эффективности включения карнозина в липосомы (ЭВ = 33%) по сравнению с использованием метода пассивной загрузки. Более того, добавление криопротектора сахарозы к липосомам привело к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы (ЭВ = 24%) по сравнению с липосомами без сахарозы. При этом эффективность включения ЛК в липосомы из ФХ при использовании метода активной загрузки практически не изменилась (ЭВ = 50%). Размеры полученных наночастиц находились в диапазоне 180–250 нм и не отличались при вариации методов их получения.

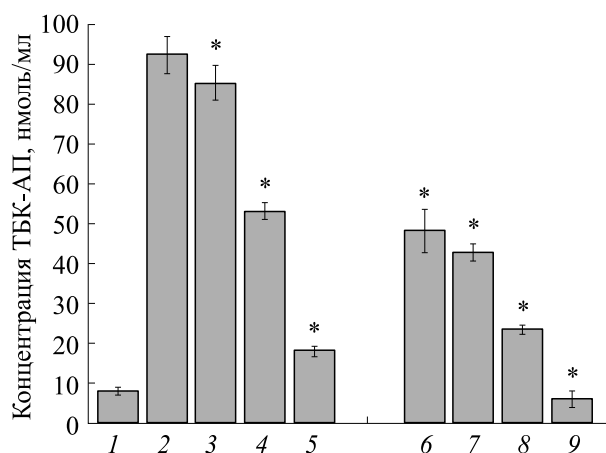
С целью исследования антиоксидантного действия карнозина, ЛК, или ЛК и карнозина совместно, входящих в состав липосом, на процесс перекисного окисления липидов на следующем этапе работы определяли содержание ТБК-АП в образцах наносупензий, содержащих антиоксиданты. Результаты проведенных исследований представлены на рис. 1.

**Таблица 3.** Липосомальный препарат, содержащий липоевую кислоту и карнозин

Состав липосом (40 мг/мл)	Действующее вещество		рН среды	ЭВ, %		Размер частиц, нм
	ЛК, мг/мл	Карнозин, мг/мл		ЛК	Карнозин	
Пассивная загрузка						
ФХ	5	20	8.2	50 ± 10	12 ± 5	245 ± 5
Активная загрузка						
ФХ	5	20	7.4	47 ± 10	33 ± 10	245 ± 5
ФХ/сахароза	5	20	7.4	53 ± 10	24 ± 10	183 ± 5

Примечание. ЛК – исходная концентрация липоевой кислоты для получения липосом; Карнозин – исходная концентрация карнозина для получения липосом; ЭВ – эффективность включения антиоксидантов в липосомы – отношение массы антиоксидантов, включенных в липосомы, к исходной массе антиоксидантов, которые брали для получения липосом.

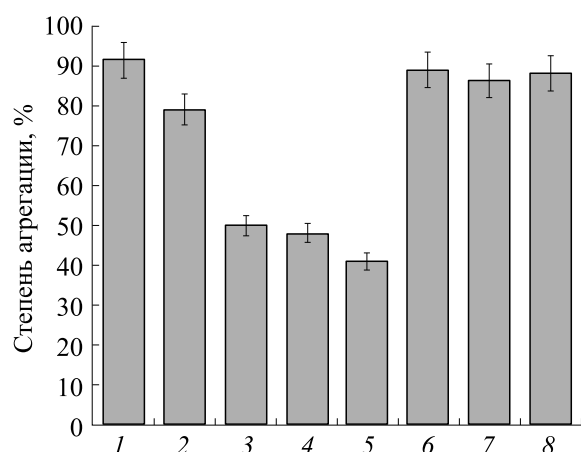
Было обнаружено, что при добавлении  $H_2O_2$  к фосфатидилхолиновым липосомам происходило повышение концентрации ТБК-АП (рис. 1, 2) по сравнению со спонтанным уровнем ТБК-АП (рис. 1, 1). Известно, что при взаимодействии пероксида водорода с фосфолипидами образуются пероксильные, алкоксильные, эпоксипероксильные, эпоксиалкильные и гидроксиалкильные ра-



**Рис. 1.** Влияние ЛК и карнозина на концентрацию ТБК-АП, образующихся в процессе перекисного окисления липидов липосом, индуцированного пероксидом водорода. Окисление липосом проводили в присутствии пероксида водорода (1 мМ) при температуре 37°C в течение 60 мин. 1 – Исходная концентрация ТБК-АП в липосомах в отсутствие пероксида водорода; 2 – липосомы без антиоксидантов в присутствии пероксида водорода (контроль); 3, 4, 5 – липосомы с карнозином (концентрация карнозина – соответственно 0.1, 1, 10 мМ); 6 – липосомы с ЛК (5 мМ); 7, 8, 9 – липосомы с ЛК (5 мМ) и карнозином (концентрация карнозина – соответственно 0.1, 1, 10 мМ). \* –  $p < 0.05$  относительно контроля.

дикалы, которые в результате дальнейшей трансформации и  $\beta$ -расщепления превращаются в продукты перекисного окисления липидов (малоновый альдегид, акролеин, 4-гидрокси-2-ноненаль и другие). Добавление пероксида водорода к липосомам, содержащим карнозин (1 и 10 мМ; рис. 1, 4, 5) или ЛК (5 мМ; рис. 1, 6), приводило к значительному уменьшению (в два-четыре раза) содержания ТБК-АП (рис. 1, 4, 5, 6;  $p < 0.05$ ). Наиболее эффективно антиоксидантные свойства проявляли оба антиоксиданта (ЛК, 5 мМ, и карнозин, 10 мМ) при окислении липидов липосом пероксидом водорода. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной пероксидации в липосомах с антиоксидантами (ЛК и карнозин; рис. 1, 9) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов; рис. 1, 2;  $p < 0.05$ ). Вероятнее всего, антиоксидантные свойства ЛК и карнозина в данной биологической системе связаны с их окислением в процессе липидной пероксидации. В условиях *in vitro* и *in vivo* при липидной пероксидации в работах [29–32] было показано, что ЛК и карнозин могут нейтрализовать различные свободные радикалы (гидроксильный, пероксильные, алкоксильные, гидроксиалкильные и другие радикалы), при этом подвергаться окислению, тем самым уменьшая образование продуктов перекисного окисления липидов.

На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных липосомальных форм антиоксидантов на функциональную активность тромбоцитов в условиях индукции агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, полученных от условно здоровых доноров. Оценивали влияние полученных липосом с ЛК и карнозином



**Рис. 2.** Влияние липосомальных и водорастворимых препаратов (ЛК, карнозин, ЛК и карнозин) на агрегацию тромбоцитов человека, обусловленную АК (здоровые доноры,  $n = 15$ ,  $1 \cdot 10^6$  кл./мл): 1 – Контроль: тромбоциты и АК; 2 – тромбоциты, липосомы без антиоксидантов, АК; 3 – тромбоциты, липосомы с карнозином (2.1 мМ), АК; 4 – тромбоциты, липосомы с ЛК (1.5 мМ), АК; 5 – тромбоциты, липосомы с ЛК (1.5 мМ) и карнозином (2.1 мМ), АК; 6 – тромбоциты, карнозин (2.1 мМ), АК; 7 – тромбоциты, ЛК (1.5 мМ), АК; 8 – тромбоциты, ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), АК.

на функциональную активность тромбоцитов в сравнении с контролями: тромбоцитами и АК, липосомами без антиоксидантов, липосомами с ЛК или с карнозином, или растворами с ЛК и карнозином в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4). Результаты проведенных исследований представлены на рис. 2.

Было показано (рис. 2), что липосомы, содержащие ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляют агрегацию тромбоцитов, вызванную АК, на 50% относительно контроля (тромбоциты и АК). При этом было обнаружено, что липосомы с ЛК (1.5 мМ) и липосомы с карнозином (2.1 мМ) ингибируют агрегацию тромбоцитов, индуцированную АК, на 62 и 42% соответственно. Также было обнаружено, что как липосомы без антиоксидантов, так и водорастворимые формы препаратов карнозина (2.1 мМ) и ЛК (1.5 мМ) практически не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов, обусловленную индуктором АК. Вероятнее всего, это связано с плохой способностью водорастворимых препаратов ЛК и карнозина проникать в клетку. Имеются сведения о том, что транспорт в цитоплазму клеток (через клеточную мембрану) ЛК и карнозина в свободном виде затруднен [33–35]. В исследованиях *in vitro* было обнаружено, что карнозин проникает в клетку через клеточную мембрану с помощью пептидного транспортера PEPT2 [36]. Поэтому с целью улучшения транспорта препаратов через плазматические мембраны могут использоваться липосомы. В ли-

тературе имеются данные о том, что липосомы могут эффективно взаимодействовать с клетками, за счет их слияния с плазматической мембраной, в процессе эндоцитоза или с помощью других механизмов [37]. Поэтому можно предположить, что липосомы, содержащие ЛК или карнозин, а также липосомальный препарат с ЛК и карнозином способны проникать через клеточную мембрану за счет слияния липосом с мембраной тромбоцитов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов пассивной и активной загрузки были получены липосомы, содержащие карнозин и ЛК, с различной эффективностью включения субстанций в наночастицы. Методом пассивной загрузки были получены как липосомы с ЛК или с карнозином, так и липосомальный препарат, содержащий ЛК и карнозин совместно, характеризующиеся 50–70% степенью включения ЛК и 15–30% включения карнозина в липосомы. При совместном включении ЭВ составляла 50% для ЛК и 12% для карнозина. При использовании метода активной загрузки были получены липосомальные формы комплексного препарата, содержащего ЛК и карнозин, при этом удалось в два раза повысить степень включения карнозина в липосомы (25–33%). Однако эффективность включения ЛК в липосомы при использовании данного метода загрузки не изменилась (ЭВ = 50%).

При изучении процесса торможения липидной перекисидации липосом, проявляющейся в уменьшении образования продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, было показано, что при использовании концентрации ЛК (5 мМ) и карнозина (0.1–10 мМ) эти субстанции в липосомах проявляют антиоксидантное действие, вероятнее всего, вследствие окисления этих антиоксидантов [29–32], тем самым уменьшая концентрацию ТБК-АП. При этом было показано, что содержание соответствующих продуктов липидной перекисидации в липосомах с антиоксидантами (ЛК и карнозин) было в 15 раз меньше, чем в контрольных липосомах (без антиоксидантов). Таким образом, можно заключить, что полученный липосомальный препарат с ЛК и карнозином является более эффективным антиоксидантом по сравнению с ЛК или карнозином.

Оценка антиагрегационных свойств липосомальных форм карнозина, ЛК или липосомального препарата, содержащего ЛК и карнозин совместно, в сравнении с их водорастворимыми формами показала, что комбинированный липосомальный препарат, содержащий ЛК (1.5 мМ) и карнозин (2.1 мМ), подавляет агрегацию тромбоцитов на 50–55% относительно контроля (тром-

боциты и АК), в то время как липосомы без антиоксидантов и водорастворимые формы препаратов ЛК и карнозин в тех же концентрациях не снижали агрегацию тромбоцитов, обусловленную индуктором агрегации АК.

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что новый липосомальный препарат с ЛК и карнозином является перспективным для дальнейших исследований по оценке его нейропротекторного действия на различных экспериментальных моделях.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Абдулджабар Балсам Тарек за получение липосомальных препаратов; руководителю Представительства компании «ЛИПОИД АГ» (Германия) в Москве к.х.н. А.В. Сымону за предоставление фосфатидилхолина Lipoïd S-100; д.б.н., проф. РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России Ю.О. Теселкину за ценные замечания и помощь в написании данной статьи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственных заданий РНИМУ им. Н.И. Пирогова (№ гос. регистрации АААА-А19-100390063-9) и Научного центра неврологии (№ гос. регистрации АААА-А19-119111290050-6).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. У всех участников было получено информированное добровольное согласие на взятие биоматериала.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. И. Гусев и В. И. Скворцова, Ишемия головного мозга (Медицина, М., 2001).
2. Э. Ю. Соловьева, О. П. Миронова, О. А. Баранова и др., Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова **108** (6), 34 (2008).
3. G. P. Biewenga, G. R. Naenen, and A. Bast, Gen. Pharmacol. **29** (3), 315 (1997).
4. A. Goraca, H. Nuk-Kolega, A. Piechota, et al., Pharmacol. Rep. **63** (4), 849 (2011).
5. W. M. Clark, L. G. Rinker, N. S. Lessov, et al., Stroke **32** (4), 1000 (2001).
6. H. Deng, X. Zuo, J. Zhang, et al., Mol. Med. Rep. **11** (5), 3659 (2015).
7. Э. И. Сайфуллина, Л. Б. Новикова, Г. Р. Иксанова и Э. М. Колчина, Клин. неврология **2**, 17 (2017).
8. Л. Б. Новикова, Г. Р. Иксанова, Э. М. Колчина и Ш. Н. Галимов, Неврологич. журн. **11** (3), 42 (2006).
9. S. Akiba, S. Matsugo, L. Packer, and T. Konishi, Anal. Biochem. **258** (2), 299 (1998).
10. А. А. Болдырев, Биохимия **77** (4), 403 (2012).
11. Y. I. Shen, P. He, Y. Y. Fan, et al., Free Radic. Biol. Med. **48** (5), 727 (2010). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.021
12. Т. Н. Федорова, С. А. Гаврилова, М. П. Морозова и др., Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии **20** (4), 25 (2017).
13. А. А. Девятов, Т. Н. Фёдорова, С. Л. Стволинский и др., Бюл. эксперим. биологии и медицины **163** (2), 156 (2017).
14. О. М. Лопачева, А. В. Лопачев, К. Н. Куличенкова и др., Анналы клин. эксперим. неврологии **12** (1), 38 (2018).
15. D. S. Berezchnoy, S. L. Stvolinsky, A. V. Lopachev, et al., Amino Acids **51** (1), 139 (2019).
16. Т. Н. Федорова, М. С. Беляев, О. А. Трунова и др., Биол. мембраны **25** (6), 458 (2008).
17. J. F. Lenny, R. P. George, A. M. Weiss, et al., Clin. Chim. Acta **123** (3), 221 (1982).
18. S. L. Stvolinsky, E. R. Bulygina, T. N. Fedorova, et al., Cell. Mol. Neurobiol. **30** (3), 395 (2010).
19. Н. А. Антонова, Г. М. Сорокоумова, Т. Н. Федорова и др., Тонкие химические технологии **11** (6), 55 (2016).
20. З. А. Суслина, М. М. Танашян и В. Г. Ионова, *Ишемический инсульт: кровь, сосудистая стенка, антитромботическая терапия* (Медицина, М., 2005).
21. З. А. Суслина, А. В. Ерофеева, М. М. Танашян и В. Г. Ионова, Неврологич. вестн. **3-4**, 5 (2005).
22. М. А. Домашенко и М. М. Танашян, Рус. мед. журн. **19** (9), 562 (2011).
23. Y. S. Lai, C. Y. Shih, Y. F. Huang, and T. C. Chou, J. Agric. Food Chem. **58** (15), 8596 (2010). DOI: 10.1021/jf101518p
24. В. А. Щелконогов, Г. М. Сорокоумова, О. А. Баранова и др., Биомед. химия **62** (5), 577 (2016).
25. Н. Ю. Никитенко, В. Х. Шаврацкий, А. А. Болдырев и др., Вопр. мед. химии **41** (1), 41 (1995).
26. Т. Н. Федорова, С. Л. Стволинский, О. И. Куликова и др., Анналы клин. эксперим. неврологии **10** (1), 47 (2016).
27. Е. Ю. Канюка и С. Г. Зиновьев, Биохимия **9** (1), 110 (2014).
28. M. Uchiyama and M. Mihara, Analyt. Biochem. **86** (1), 271 (1978).
29. K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, et al., Biochim. Biophys. Acta **1790** (10), 1149 (2009). DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.07.026
30. B. J. Lee and D. G. Hendricks, J. Food Sci. **62** (5), 931 (1997). DOI: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb15009.x



31. C. V. Krishnan and M. Garnett, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **6**, 3607 (2011).
32. A. R. Smith, S. V. Shenvi, M. Widlansky, et al., *Curr. Med. Chem.* **11** (9), 1135 (2004). DOI: 10.2174/0929867043365387
33. H. Ihara, Y. Kakihana, A. Yamakage, et al., *J. Biol. Chem.* **294** (4), 1279 (2019).
34. K. P. Shay, R. F. Moreau, E. J. Smith, and T. M. Hagen, *IUBMB Life* **60** (6), 362 (2008).
35. G. J. Handelman, D. Han, H. Tritschler, and L. Packer, *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1725 (1994).
36. A. V. Lopachev, O. M. Lopacheva, D. A. Abaimov, et al., *Biochemistry* **81** (5), 511 (2016).
37. N. Duzgunes and S. Nir, *Adv. Drug Delivery Rev.* **40**, 3 (1999).

## A Liposomal Drug with Carnosine and Lipoic Acid: Preparation, Antioxidant and Antiplatelet Properties

V.A. Shchelkonogov<sup>\*, \*\*, \*\*\*</sup>, E.S. Darnotuk<sup>\*</sup>, A.V. Chekanov<sup>\*\*, \*\*\*</sup>, O.A. Baranova<sup>\*\*</sup>, K.D. Kazarinov<sup>\*\*\*\*</sup>, N.S. Shastina<sup>\*</sup>, S.L. Stvolinsky<sup>\*\*\*\*</sup>, T.N. Fedorova<sup>\*\*\*\*</sup>, E.Y. Solovieva<sup>\*\*</sup>, A.I. Fedin<sup>\*\*</sup>, and G.M. Sorokoumova<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

<sup>\*\*</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*\*</sup>Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, pl. Vvedenskogo 1, Fryazino, Moscow Region, 141190 Russia

<sup>\*\*\*\*</sup>Research Center of Neurology, Volokolamskoye Shosse, 80, Moscow, 125367 Russia

The conditions have been created to produce phosphatidylcholine liposomes containing both lipoic acid and carnosine. The obtained liposomes are spherical particles with a size of 180–250 nm, characterized by the efficiency of the lipoic acid (50–70%) and carnosine (17–33%) inclusion. The oxidation of phosphatidylcholine by hydrogen peroxide was used as a model to show the antioxidant effects of carnosine, lipoic acid or the combined effects of lipoic acid and carnosine: the inclusion of carnosine and lipoic acid led to inhibition of lipid peroxidation process through a decrease in the formation of lipid peroxidation products to react with thiobarbituric acid. The study found antioxidant activity of lipoic acid (5 mM) and carnosine (0.1–10 mM) in liposomes. Also, it was shown that the amount of the relevant products of lipid peroxidation in liposomes with antioxidants (lipoic acid and carnosine in common) was 15 times lower than that in control liposomes (without antioxidants). The effects of the obtained liposomes on platelet aggregation induced by arachidonic acid were assessed. Results have indicated that liposomes with lipoic acid (1.5 mM) together with carnosine (2.1 mM) suppress platelet aggregation by 50%, while liposomes without antioxidants and water-soluble forms of carnosine and lipoic acid have virtually no effect on platelet aggregation, caused by arachidonic acid.

*Keywords:* liposomes, carnosine, lipoic acid, TBA-active products, arachidonic acid