

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОСОМ, РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ИЗ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, ПРИНИМАВШИХ НАНОЛИПОСОМАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

© 2021 г. Н.П. Пальмина, Н.Н. Сажина, Н.Г. Богданова, А.С. Антипова, Е.И. Мартирасова,
И.Г. Плащина, В.В. Каспаров, М.Г. Семёнова

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

E-mail: npalm@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2021 г.

После доработки 09.07.2021 г.

Принята к публикации 13.07.2021 г.

Изучены физико-химические свойства липидов важнейших органов мышей (печени и головного мозга) после длительного приема в течение трех месяцев нанолипосомальных комплексов, состоящих из различных вариаций следующих веществ: фосфатидилхолина сои, эфирного масла гвоздики, рыбьего жира и казеината натрия. Из суммарных липидов органов готовили липосомы и определяли их способность к иницированному окислению, структуру липидного бислоя в областях локализации спиновых зондов 5-доксил и 16-доксил-стеариновых кислот, размеры и заряд липосом. Установлено, что все изученные параметры значительно изменялись с возрастом животных: способность к окислению уменьшалась в липидах из обоих органов; микровязкость уменьшалась, а структурированность возрастала; размеры липосом из липидов печени увеличивались, а из липидов головного мозга — уменьшались; применение диет приводило к приближению исследуемых величин к уровню, характерному для молодых животных. Установлена корреляция окисляемости липидов и их микровязкости с изменением состава жирных кислот, а размеров липосом — с параметром упорядоченности поверхностных слоев липидов.

Ключевые слова: липосомы, способность липидов к окислению, структура мембран, диаметр и заряд липосом.

DOI: 10.31857/S0006302921050100

Для нормального функционирования организма чрезвычайно важно его обеспечение эссенциальными (незаменимыми) биологически активными липидами, такими как полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) омега-3 и омега-6. Они не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей в достаточном количестве и в оптимальном соотношении (омега-6 : омега-3 = 1 : 1 – 4 : 1) [1, 2]. Включение этих веществ в диету актуально для большинства населения и может быть осуществлено с помощью функциональных продуктов питания [3]. Серьезная проблема, с которой сталкиваются исследователи, заключается в том, что высокое содержание в ПНЖК ненасыщенных углеродных связей

увеличивает их окисляемость и, как следствие, накопление пероксидов и гидропероксидов, продуктов их разложения, обладающих токсичностью, а также летучих карбонильных продуктов, снижающих вкусовые качества продуктов. Для преодоления этих ограничений предлагается вводить ПНЖК в нужном соотношении в виде липосом с добавками природных антиоксидантов и инкапсулированием в белки или биополимеры [4, 5]. В результате комплекса исследований, выполненных *in vitro*, нами были получены липосомы на основе фосфатидилхолина (ФХ) или лизофосфатидилхолина, нагруженные ПНЖК в соответствующем отношении и содержащие растительные антиоксиданты (эфирное масло гвоздики (ЭМГ), кориандра, лимона; экстракты имбиря, черного перца, корицы, душистого перца), а также казеинат натрия (Каз-Na) и мальтодекстрины. Были изучены физико-химические свойства этих сложных липосом (размеры и форма, плотность, архитектура, заряд, микровяз-

Сокращения: ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты, ФХ — фосфатидилхолин сои, ЭМГ — эфирное масло гвоздики, Cas-Na — казеинат натрия, РЖ — рыбий жир, ПОЛ — перекисное окисление липидов, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, АОА — антиокислительная активность.

кость липидного бислоя; способность к окислению; термодинамические параметры) [6–9]; определена биодоступность инкапсулированных липидов в процессе ферментативного гидролиза комплексов в условиях их модельного переваривания в желудочно-кишечном тракте (ротовая полость, желудок, тонкий кишечник) *in vitro* [10]; установлены основные взаимосвязи между структурными, а также термодинамическими параметрами супрамолекулярных комплексов и их функциональными свойствами [7, 10, 11]. В экспериментах *in vivo* были получены подтверждения высказанным предположениям: наноконплексы действительно способствовали повышению содержания ПНЖК и антиоксидантов в органах и тканях мышей [12, 13]. Важным аспектом влияния этих наноконплексов на организм человека и животных является изменение физико-химических свойств липидов. Одной из моделей, используемых в исследованиях этих свойств, являются липосомы, реконструированные из суммарных липидов какого-либо из органов животных, подвергшихся тому или иному воздействию [14, 15]. Мы применили эту модель для изучения некоторых физико-химических характеристик липидов (способности к окислению, микровязкости и ригидности липидного бислоя, размеров и поверхностного заряда) из органов мышей, принимавших в течение длительного времени нанолипосомальные комплексы различного состава, что и составило цель нашей работы.

МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин фирмы Lipoid GmbH (Германия) следующего химического состава по данным производителя: фосфолипиды – 94% фосфатидилхолина, 0.6% фосфатидилэтаноламина, 3% лизофосфатидилхолина, 0.1% фосфатидилинозита; триглицериды – 2%; свободные жирные кислоты – 0.5%; α -токоферол – 0.15%. Использовали также казеинат натрия фирмы Sigma (Новая Зеландия); эфирное масло гвоздики фирмы Plant Lipids Ltd (Индия); рыбий жир (РЖ, концентрат омега-3 «Омега-3 дети», ООО «РУСКАПС», Москва), азо-инициатор 2.2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлорид (Fluka, Германия); органические растворители фирмы Merck (Германия).

Состав липосомальных наноконплексов. В экспериментах были использованы водные растворы шести видов липосомальных наноконплексов 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 липосомального наноконплекса: ФХ : ЭМГ = 1 : 0.02.

Диета 3. Липосомы из ФХ (с концентрацией в растворе [ФХ] = 1.66 мг/мл), инкапсулированные казеинатом натрия (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 16.6 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконплексе: 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 липосомальном наноконплексе 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 (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 липосомальном наноконплексе 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), инкапсулированные Каз-Na (с концентрацией в растворе [Каз-Na] = 33.3 мг/мл). Весовое отношение компонентов в липосомальном наноконплексе: ФХ : РЖ : ЭМГ : Каз-Na = 1 : 1 : 0.02 : 20.

Приготовление липосом. Липосомы из ФХ с добавлением ЭМГ и/или РЖ готовили по следующей методике: в стерилизованные при 110°C (30 мин) стеклянные стаканчики помещали необходимые навески ФХ/ЭМГ/РЖ и добавляли в них расчетное количество 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, используя ультразвуковой гомогенизатор VCSX-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 : 30 с); такой режим озвучивания повторяли семикратно. При озвучивании образец охлаждали во льду. После этого проводили центрифугирование полученных водных растворов липосомных комплексов ФХ/ЭМГ/РЖ в стерилизованных (при 110°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-Na) приготовленных липосом (ФХ/ЭМГ/РЖ) проводили сме-

шиванием их растворов в стерилизованных (при 110°C, 30 мин) бутылочках для кормления с последующим встряхиванием (165 об/мин) в шейкер-инкубаторе (GFL 3032, Германия) при 40°C в течение 1 ч. После этого повышали температуру в шейкер-инкубаторе до 63°C и пастеризовали все приготовленные растворы в течение 30 мин при 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(C57blxDВА2\6) массой 18–20 г из вивария питомника «Столбовая» НЦБТ ФМБА РФ были разделены на восемь групп по шесть-семь мышей в каждой группе. Мышей содержали на диете в течение 92 суток. Группа 1 (7 животных) получала общевиарный рацион и была забита в первый день эксперимента. Группа 2 (6 животных) получала диету 1, группа 3 (6 животных) – диету 2, группа 4 (6 животных) – диету 3, группа 5 (6 животных) – диету 4, группа 6 (6 животных) – диету 5; группа 7 (6 животных) – диету 6; группу 8 (7 животных) содержали на общевиарном рационе все 92 суток эксперимента. Через 92 суток после начала приема различных диет животные были забиты методом декапитации, ткани печени и головного мозга были взяты для исследования.

Выделение липидов из печени и мозга. Экстракцию липидов из тканей печени и головного мозга проводили по методу Блайя и Дайера в модификации Кейтса [16, 17].

Приготовление липосом из липидов печени и мозга. Липосомы готовили из навесок суммарных липидов печени или мозга, полученных из экстрактов липидов после выпаривания растворителя в вакууме. Далее к сухой навеске известной массы добавляли фосфатный буферный раствор (рН 7.2, ионная сила 1 мМ) в объеме, необходимым для получения заданной концентрации суспензии липидов (1 или 3 мг/мл). Липосомы формировали с использованием ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonic & Materials, США) в течение 15 мин (в режиме 15 с × 15 с) при мощности 70 Вт. Для предохранения липосом от нагревания и окисления во время озвучивания сосудов с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Для отделения примесей дисперсию липосом центрифугировали со скоростью 13000 об/мин при 4°C в течение 20 мин [8].

Окисление липосом. Иницированное окисление липосом проводили по методу [8, 18] в пробирках, термостатированных при физиологической (37°C) температуре. Для иницирования использовали водорастворимый азо-инициатор 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлорид (с конечной концентрацией в растворе липосом

0.33 мМ). Степень развития перекисного окисления липидов (ПОЛ) контролировали спектрофотометрически при непрерывной регистрации во времени оптической плотности в области поглощения 234 нм, соответствующей максимуму поглощения для диеновых конъюгатов на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, Германия). На рис. 1 приведены характерные кинетические кривые окисления липосом (накопления диеновых конъюгатов) из липидов печени и мозга.

Метод динамического светорассеяния. Для определения размеров липосом использовали метод динамического светорассеяния. Измерения среднего диаметра D липосом проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм. Концентрация липидов в суспензии липосом составляла 0.3 мг/мл, температура 25°C, индекс полидисперсности варьировал в пределах 0.21–0.36. Для каждого размера D осуществлялась регистрация 5–10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении, усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Для измерения ζ -потенциала липосом этот же прибор использовали в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц. Усреднение максимальных значений ζ -потенциала осуществляли по результатам трех повторных измерений, погрешность которых не превышала 10%.

Метод спиновых зондов. Для характеристики структурного состояния мембран липосом использовали метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Образец для измерений на ЭПР-спектрометре представлял собой 200 мкл суспензии липосом (концентрация липидов 3 мг/мл), к которому добавляли 1 мкл спиртового раствора парамагнитного зонда (концентрация зонда в спирте 10^{-4} М), из расчета 1 молекула зонда на 900–1000 молекул липида. Этот образец после инкубации с зондом в течение 15–20 мин при 4°C помещали в длинную, узкую с плоскопараллельными гранями кварцевую кювету высокой добротности, благодаря чему достигалась температурная однородность по всему объему кюветы. Термостатирование осуществляли с помощью термоприставки ER 4131 VT (Bruker, Германия). Точность термостатирования контролировали термопарой, помещенной в резонатор, она составила ± 0.05 °C. Запись спектров при постоянной температуре 293 К осуществляли непрерывно: 10–15 спектров по 3–5 накоплений. Параметры, характеризующие структуру мембран, рассчитывали из спектров, полученных при температуре 293 К на ЭПР-спектрометре

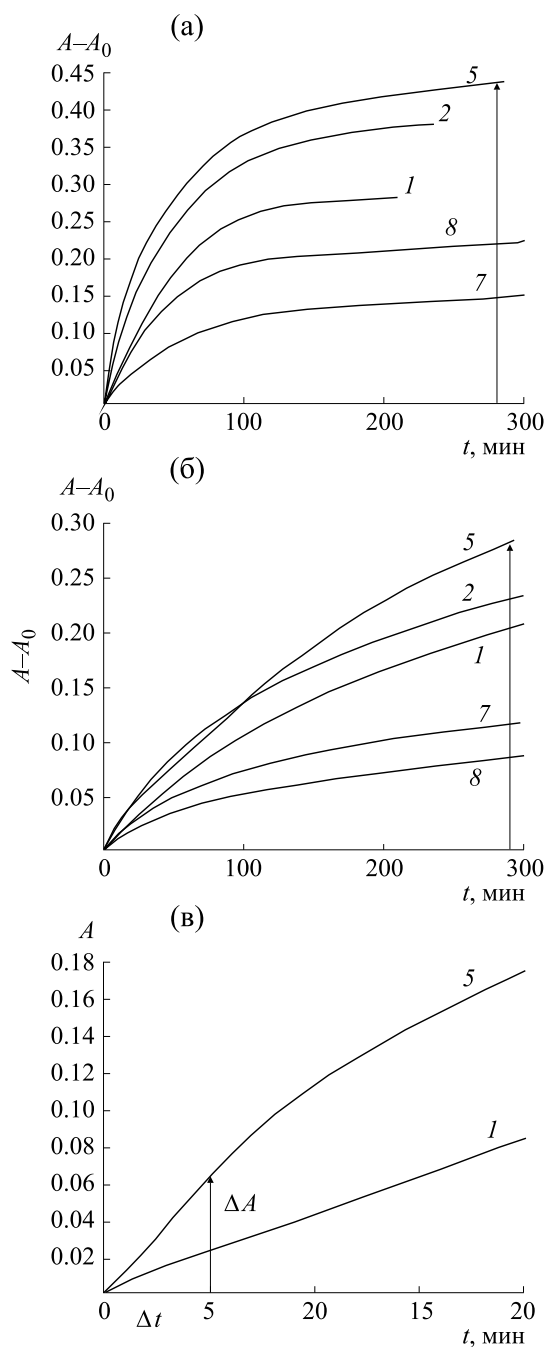


Рис. 1. Характерные кинетические кривые инициированного окисления (накопления диеновых конъюгатов) липосом из липидов печени (а) и мозга (б). Концентрация липосом 0.1 мг/мл, $[AAPH] = 0.33$ мМ, цифры около кривых – номера групп мышей, $A-A_0$ – изменение оптической плотности в процессе окисления. Стрелками показано, как определялись максимальные значения $A-A_0$. (в) – Фрагмент рисунка (а) для демонстрации расчета V_{max} .

Bruker 200D (Bruker, Германия) методом спинового зонда [19], в качестве которого для изучения микровязкости глуболежащих областей липидного бислоя (~ 20 Å) использовали 16-докси-

лстеариновую кислоту (зонд С16). Микровязкость мембраны в области локализации зонда С16 оценивали по временам вращательной корреляции зонда τ_{C1} и τ_{C2} , которые определяли по формулам для быстрого анизотропного вращения радикалов [19]:

$$\tau_{c_1} = 6,5 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10},$$

$$\tau_{c_2} = 6.65 \cdot \Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10},$$

где ΔH_+ и ΔH_0 – ширины низкопольной и центральной компонент спектральной линии соответственно, а I_+ , I_0 и I_- – интенсивности низкопольной, центральной и высокопольной компонент спектра ЭПР (рис. 2а). Так как при всех воздействиях количественный эффект по отношению как к τ_{C1} , так и к τ_{C2} был абсолютно одинаковым, а величина τ_{C1}/τ_{C2} не изменялась, что говорит об отсутствии влияния исследуемых агентов на анизотропию вращения зонда С16, то в дальнейшем для сравнения использовали параметр τ_{C1} . Для оценки состояния липидов в поверхностных слоях липосом (~ 8 Å) использовали 5-доксилстеариновую кислоту (зонд С5). Спектры зонда С5 характеризовали параметром упорядоченности S , зависящим от амплитуды отклонения продольной оси жирнокислотной цепи зонда относительно среднего направления ориентации окружающих его липидов. Для расчета параметра S использовали уравнение $S = 1.66 \cdot (H_{//} - H_{\perp}) / (H_{//} + 2H_{\perp})$ [19], где $2H_{//}$ – расстояние между низко- и высокопольными (внешними) экстремумами спектра, $2H_{\perp}$ – между внутренними экстремумами (рис. 2б). Расчет параметров τ и S по спектрам ЭПР проводили в полуавтоматическом режиме с помощью программы Origin 6.1 с использованием стандартных алгоритмов поиска экстремумов при заданном шаге дискретизации 0.05 Гс. В результате погрешность измерения расстояния между экстремумами в хорошо разрешенном спектре ЭПР не превышала 0.2 Гс, а суммарная ошибка вычисления отдельных значений τ и S по экспериментальным спектрам ЭПР зондов С16 и С5, полученным в результате трех-пяти накоплений, не превышала 0.03 нс и 0.002 соответственно.

Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Origin Pro 8. Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна–Уитни.

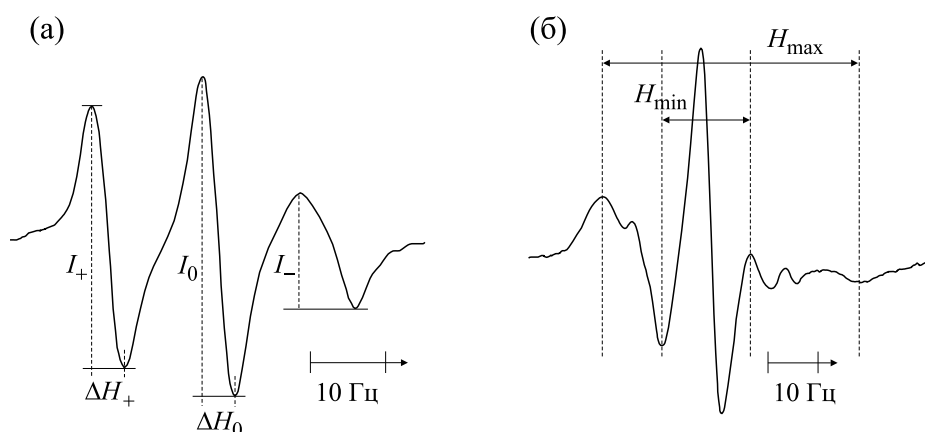


Рис. 2. ЭПР-спектры зондов С16 (а) и С5 (б) в липидном бислое липосом при температуре 293 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как указывалось выше, основными препятствиями на пути использования нанолипосомальных комплексов в качестве контейнеров для переноса ПНЖК в организм животных и человека является высокая способность липидов и самих ПНЖК к окислению. Поэтому в первую очередь нас интересовал вопрос о том, как длительное применение диет с липосомами различного состава влияет на способность к окислению липидов основных органов животных – печени и головного мозга. Для оценки этого параметра мы использовали модель инициированного окисления липосом, приготовленных из суммарных липидов этих органов. В качестве физико-химической характеристики данного процесса применяли величины максимальной скорости (V_{max}) и максимальной величины содержания диеновых конъюгатов ($A - A_0$), которая достигалась при окислении (рис. 1а,б).

Так как максимальная скорость достигалась в начале окисления, ее определяли как $(\Delta A/\Delta t)$ на отрезке от 0 до 5 мин, где ΔA – приращение оптической плотности за это время (рис. 1в). Видно, что окисление липидов в липосомах из печени и мозга значительно отличается. Для липосом из липидов печени характерны более высокие значения скорости окисления липидов печени на начальном участке кривых (примерно до 100 мин) (рис. 1а). Затем скорость накопления диеновых конъюгатов уменьшается, в то время как у липосом из липидов головного мозга (рис. 1б) максимальная скорость окисления значительно меньше и снижается медленнее в течение окислительного процесса. Такой ход кривых можно объяснить различным соотношением в липидах печени и мозга поли-, моно- и ненасыщенных жирных кислот, имеющих на порядок различающиеся константы окисления [8]. Сравнительные диаграммы для V_{max} и $A - A_0$ всех групп мышей

представлены на рис. 3. Видно, что в липосомах, приготовленных из липидных экстрактов печени и головного мозга мышей разного возраста, при старении (группы 1 и 8 соответственно) происходит уменьшение и V_{max} и $A - A_0$, причем в липосомах из печени в большей степени меняется V_{max} – в 1.3 раза, а в липосомах из головного мозга – $A - A_0$ – в 1.76 раза. В группах 2, 3, 5 и 6 в липидах из обоих органов увеличиваются оба параметра по сравнению с возрастным контролем (группа 8). На общем фоне выделяется группа 7 животных, получавшая диету из липосом (ФХ + ЭМГ + РЖ + Cas–Na), для которой отмечено уменьшение и V_{max} и $A - A_0$ в липосомах из липидов печени и незначительные отклонения от контроля в липосомах из липидов головного мозга. Между параметрами $A - A_0$ и V_{max} для липосом обоого типа наблюдается хорошая прямолинейная зависимость (рис. 4, таблица), что, с одной стороны, хорошо объяснимо с точки зрения закономерностей ПОЛ в липосомах и мембранах [20–22], но с другой – несколько удивляет из-за весьма сложного состава субстрата окисления и присутствующих добавок. Также следует отметить тот факт, что изменения в закономерностях ПОЛ липосом из липидов печени и головного мозга при использовании липосомальных диет происходят синхронно: между исследуемыми параметрами ПОЛ (V_{max} печени и V_{max} головного мозга, $A - A_0$ печени и $A - A_0$ головного мозга) существует хорошая корреляция (рис. 4, таблица), что позволяет полагать наличие общей закономерности в устойчивости к окислительным процессам во всем организме животных.

Известно, что реакции ПОЛ регулируются такими параметрами, как степень ненасыщенности субстрата окисления [20, 21] и присутствием антиоксидантов [23, 24]. Так как ранее нами было установлено, что прием используемых диет ока-

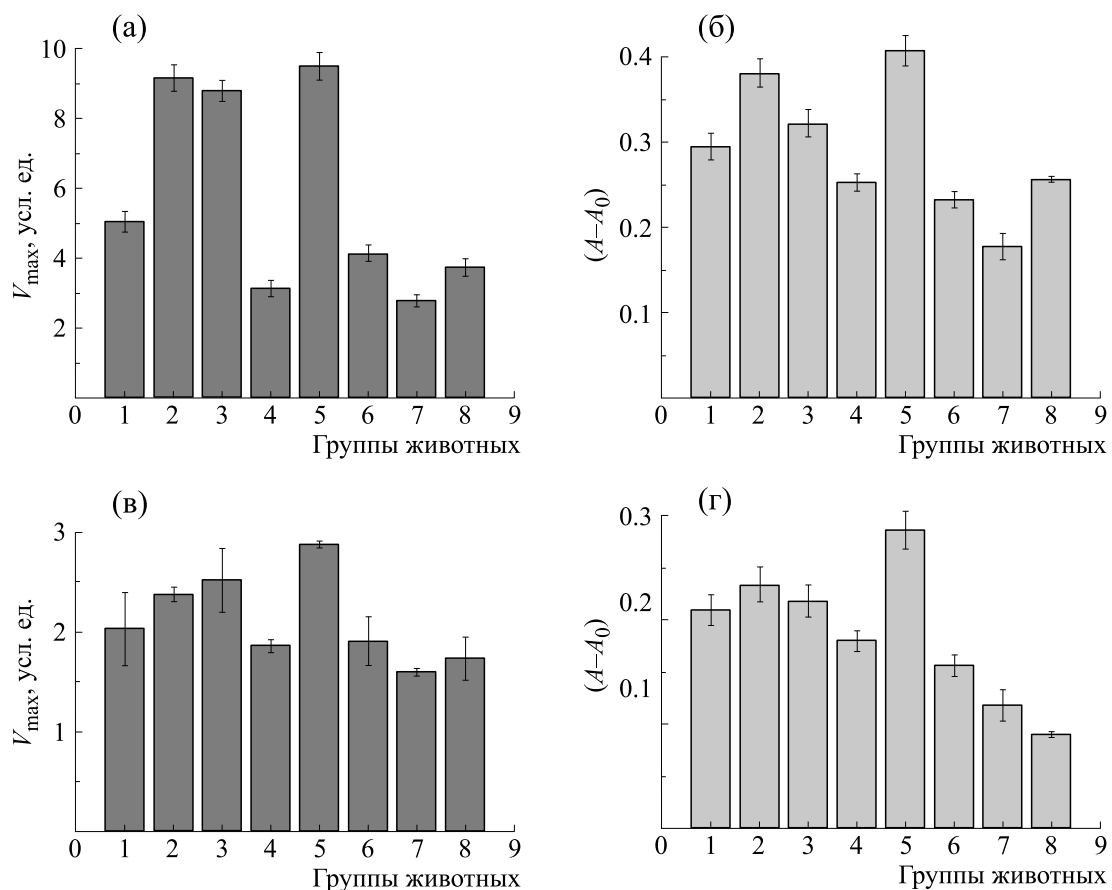


Рис. 3. Максимальные скорости окисления липидов (а, в) и максимальные уровни содержания диеновых конъюгатов (б, г) в липосомах из липидов печени (верхний ряд) и головного мозга (нижний ряд) мышей, принимавших нанокмлексы липосом различного состава. По оси абсцисс – номера групп животных; по оси ординат – V_{\max} в усл. ед. и разности $(A-A_0)$ в единицах оптической плотности.

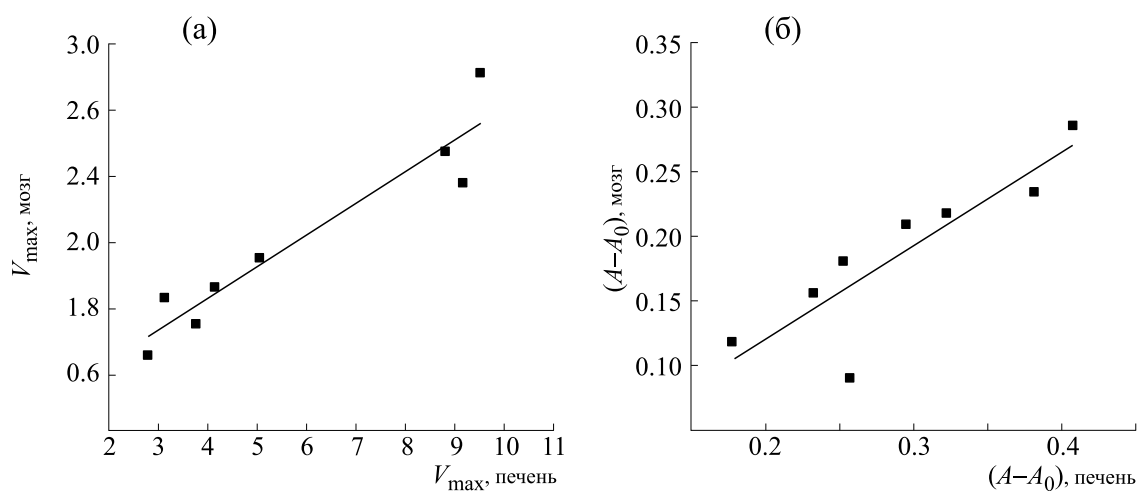


Рис. 4. Взаимосвязь максимальных скоростей окисления (а) и максимальных значений уровня гидроперекисей (б) в печени и головном мозге мышей, принимавших наноллипосомы различного состава.

Коэффициенты корреляции между различными физико-химическими характеристиками липосом из липидов печени и головного мозга мышей, содержащихся на нанолипосомальных диетах

Сочетания	<i>R</i>	<i>p</i>
Печень		
$A - A_0$ и V_{\max}	0.9267	<0.001
V_{\max} и Σ ПНЖК	Нет зависимости	
V_{\max} и Σ (ПНЖК+МНЖК)	0.6890	<0.05
V_{\max} и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	0.5850	<0.05
$A - A_0$ и Σ ПНЖК	Нет зависимости	
$A - A_0$ и Σ (ПНЖК+МНЖК)	0.6897	<0.05
$A - A_0$ и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	0.6296	<0.05
$A - A_0$ и АОА	Нет зависимости	
V_{\max} и АОА	Нет зависимости	
τ_{C1} и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	0.7615	<0.05
τ_{C1} и АОА	0.5600	<0.05
S и АОА	0.3419	<0.1
Головной мозг		
$A - A_0$ и V_{\max}	0.9153	<0.001
V_{\max} и Σ ПНЖК	0.7740	<0.05
V_{\max} и Σ (ПНЖК+МНЖК)	0.8380	<0.05
V_{\max} и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	0.7525	<0.05
$A - A_0$ и Σ ПНЖК	0.5920	<0.1
$A - A_0$ и Σ (ПНЖК+МНЖК)	0.6584	<0.1
$A - A_0$ и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	Нет зависимости	
V_{\max} и АОА	Нет зависимости	
$A - A_0$ и АОА	Нет зависимости	
τ_{C1} и Σ (ПНЖК+МНЖК)/ Σ НЖК	0.4950	<0.1
τ_{C1} и АОА	0.5200	<0.1
S и АОА	Нет зависимости	
Печень и головной мозг		
V_{\max} печени и V_{\max} головного мозга	0.9485	<0.001
$A - A_0$ печени и $A - A_0$ мозга	0.8705	<0.001
τ_{C1} печени и τ_{C1} головного мозга	Нет зависимости	
S печени и S головной мозга	Нет зависимости	
τ_{C1} печени и D	Нет зависимости	
τ_{C1} головного мозга и D	Нет зависимости	
S печени и D	Нет зависимости	
S головного мозга и D	0.6116	<0.1
$(S$ печени + S головного мозга) и D	0.5627	<0.05

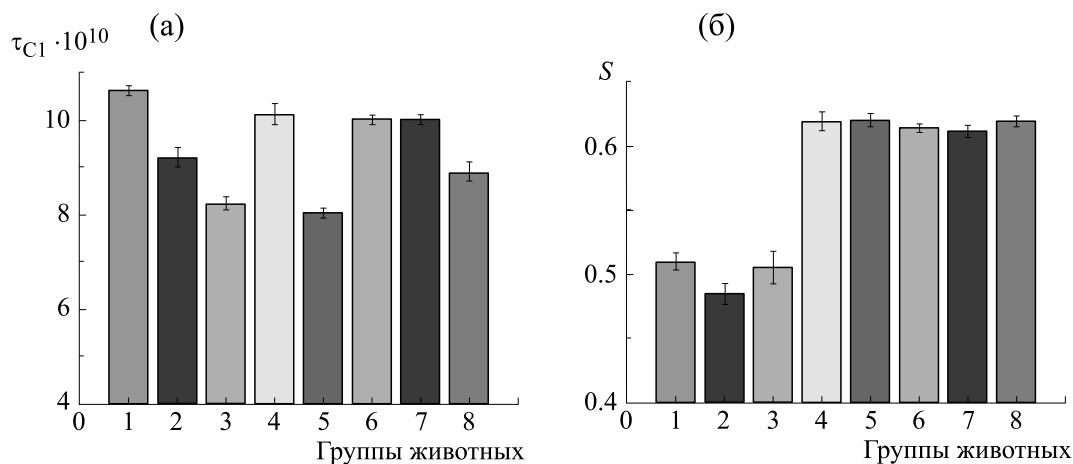


Рис. 5. Микровязкость глубоколежащих слоев (а) и степень упорядоченности поверхностных слоев (б) липидов в липосомах из липидов печени мышей, содержащихся на различных липосомных диетах.

зывает влияние на эти характеристики [12, 13], мы использовали их для проведения ряда корреляций с результатами настоящей работы (таблица). Так как для модельных липосомальных систем относительно простого липидного и жирнокислотного состава высказано несколько положений о возможном вкладе различных показателей в процессы окисления: общей степени ненасыщенности липидов, доли полиненасыщенных жирных кислот, суммы поли- и мононенасыщенных жирных кислот ($\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$), отношения этой суммы к сумме насыщенных жирных кислот ($\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$) и т.д. [20–22], мы оценили степень корреляции V_{\max} и $A - A_0$ для липосом из липидов печени и головного мозга с этими показателями, результаты представлены в таблице. Из них следует, что для липосом из липидов головного мозга наблюдается достаточно хорошая и статистически достоверная корреляция между V_{\max} и $\Sigma\text{ПНЖК}$; $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$; $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$, в то время как для липосом из липидов печени она достоверна только для $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$. Для параметра $A - A_0$ характерна достоверная корреляция с $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и в липосомах из липидов печени, и в липосомах из липидов головного мозга; с $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК}) -$ в липосомах из липидов печени и $\Sigma\text{ПНЖК}$ в липосомах из липидов мозга. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наибольшая зависимость параметров, характеризующих ПОЛ в сложных системах переменного липидного состава, выявлена для величины $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$.

Между параметрами V_{\max} и АОА, а также $A - A_0$ и АОА корреляция не обнаружена (таблица), данный результат можно объяснить тем, что наличие антиоксидантов главным образом влияет на пе-

риод индукции на кривых окисления, но не на его скорость [23, 24].

Одним из важных физико-химических показателей, связанных с регуляторными процессами ПОЛ в биологических мембранах, являются параметры микровязкости липидов, образующих структуру мембран [25, 26]. Поэтому мы в исследовании определяли микровязкость тех слоев липидов, где расположены жирнокислотные остатки липидов, используя в качестве зонда парамагнитный свободный радикал С16-доксилстеариновую кислоту, а также ригидность поверхностных слоев липидов, применяя в качестве зонда С5-доксилстеариновую кислоту. Полученные результаты для липосом из липидов печени представлены на рис. 5.

Из рис. 5а следует, что величина τ_{C1} , характеризующая микровязкость липидов, статистически достоверно ($p < 0.05$) уменьшается с увеличением возраста животных (группа 8 по сравнению с группой 1) в 1.19 раза; использование диет с липосомами из (ФХ+ЭМГ) и (ФХ+ЭМГ+Cas-Na) усиливает этот эффект, вызывая дополнительное снижение τ_{C1} еще на 8%. В группах 4, 6 и 7 τ_{C1} достоверно увеличивается по сравнению с контрольной группой 8 и приближается к значениям, характерным для молодых животных группы 1. Жесткость поверхностных слоев липидов в липосомах из суммарных липидов печени (параметр упорядоченности S) с возрастом статистически достоверно увеличивается в 1.25 раза; диеты, используемые в группах 4, 5, 6 и 7, не влияют на этот процесс, снижение этой величины до уровня нормы наблюдается только в группах 2 и 3. На рис. 6 приведены данные о микровязкости липидов и их упорядоченности в липосомах из липидов головного мозга различных групп животных. Следует отметить, что оба изучаемых параметра (τ_{C1} и S)

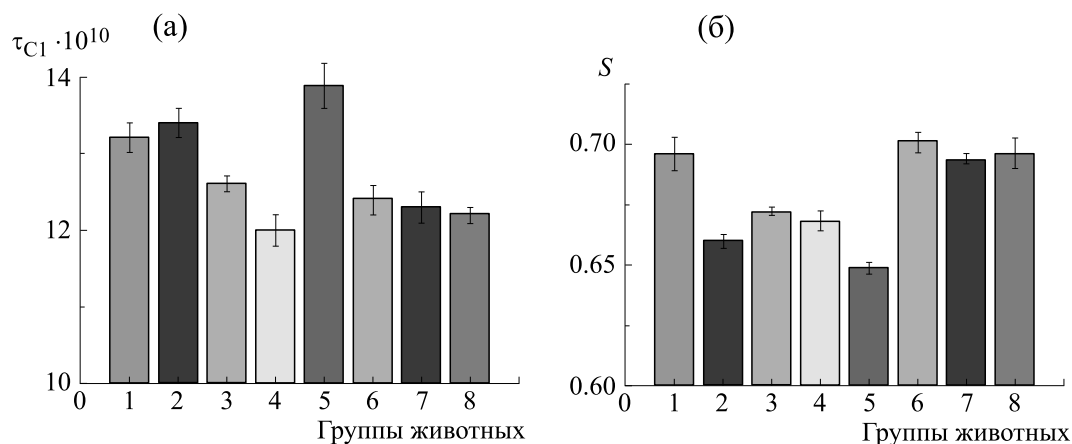


Рис. 6. Микровязкость глубоколежащих слоев (а) и степень упорядоченности поверхностных слоев (б) липидов в липосомах из липидов головного мозга мышей, содержащихся на различных липосомных диетах.

существенно превышают аналогичные характеристики для липосом из печени тех же животных: если в липосомах из липидов печени параметр τ_{C1} изменяется в пределах от 8×10^{-10} до 11×10^{-10} с, а S — от 0.45 до 0.6, то в липосомах из липидов головного мозга уровень этих изменений составляет $(12-14) \times 10^{-10}$ с и 0.65–0.75 соответственно. Это связано с относительно более высоким содержанием холестерина и более низким содержанием ПНЖК в липидах головного мозга по сравнению с липидами печени по отношению к суммарным липидам этих органов [27].

В липосомах из липидов головного мозга (рис. 6), так же как и в липосомах из липидов печени, с увеличением возраста животных наблюдается уменьшение параметра τ_{C1} в 1.1 раза, прием большинства диет приводил к увеличению этого параметра, наиболее достоверное изменение отмечено в группе 5, которая принимала диету (ФХ + ЭМГ + Cas-Na). Сопоставление изменений τ_{C1} и S в липосомах из липидов печени и головного мозга (таблица) говорит об отсутствии аналогии в изменении вязкостных параметров липидов этих органов после приема нанолипосомальных комплексов. Вязкостные характеристики липидов зависят от целого ряда параметров: степени ненасыщенности липидов, относительного содержания фосфолипидов и холестерина, отношений холестерин:общие липиды; холестерин:фосфолипиды; холестерин:сфингомиелин и т.д. [28–33]. При этом холестерин в зависимости от его концентрации и характера взаимодействия с ПНЖК и НЖК может играть двойственную роль — как увеличивать, так и уменьшать вязкость липидного бислоя [31–33]. Поскольку в наших экспериментах мы оценивали структурные изменения в липосомах, приготовленных из сложной смеси липидов, вполне объяснимо, что для каж-

дой конкретной группы животных трудно выделить какой-либо единственный параметр, вносящий определяющий вклад в величины τ_{C1} и S .

Известно, что микровязкость глубоко лежащих слоев липидов в биологических мембранах и липосомах во многом определяется составом жирных кислот липидов [28–30]. Так как использование предложенных нами диет было направлено именно на изменение этого состава, что и было установлено в нашей предыдущей работе [12], мы оценили степень корреляции между параметром τ_{C1} и различными общими характеристиками состава жирных кислот, результаты приведены в таблице. В липосомах из липидов печени была обнаружена достаточно хорошая и статистически достоверная ($p < 0.05$) корреляция между τ_{C1} и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})/\Sigma\text{НЖК}$; аналогичная, но менее достоверная ($p < 0.1$) зависимость между этими же величинами установлена и для липосом из головного мозга. Принимая во внимание тот факт, что выводы литературных источников о закономерностях зависимости микровязкости липидов в липосомах основываются на экспериментах, проведенных с использованием фосфолипидов достаточно простого состава [29, 31–33], а в экстрактах из органов мышей присутствует не только большое разнообразие фосфолипидов, но и нейтральные липиды, можно считать полученные нами корреляции вполне удовлетворительными.

Так как в системе регуляции ПОЛ микровязкость липидов тесно связана с уровнем их антиокислительной активности (АОА), а ранее нами было установлено, что все используемые нанолипосомальные комплексы влияли на суммарную АОА и печени, и головного мозга мышей [13], мы также использовали данные этой работы для корреляции с параметром τ_{C1} . Из таблицы следует,

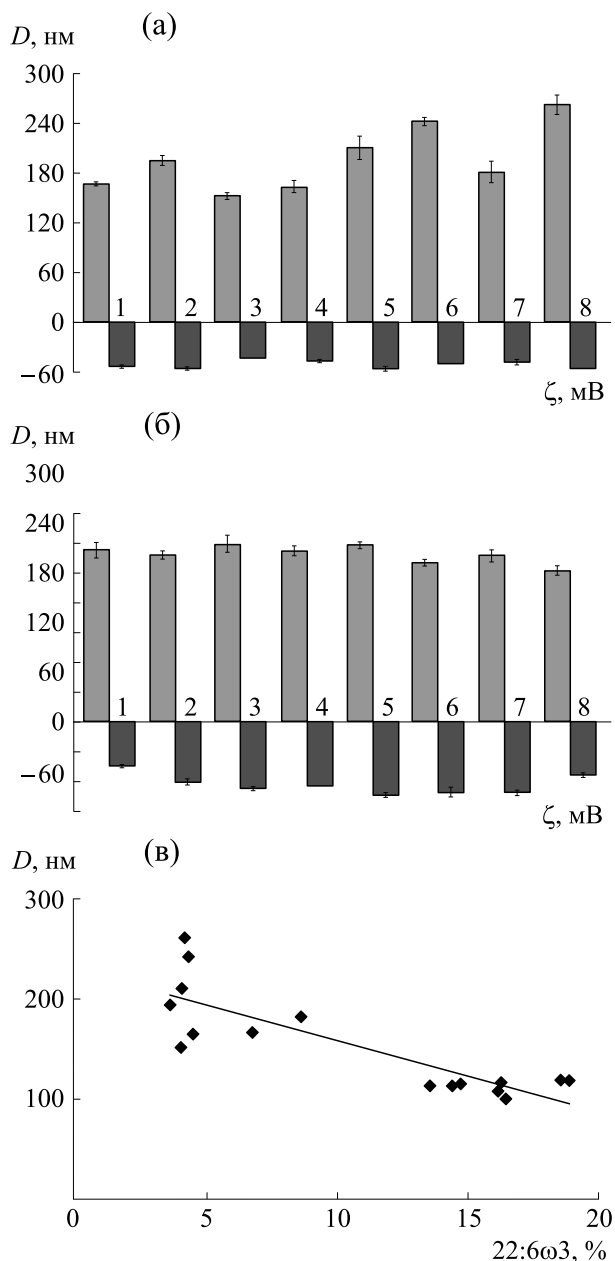


Рис. 7. Средний диаметр D и ζ -потенциал липосом из липидов печени (а) и головного мозга (б) мышей. Зависимость диаметра липосом от относительного содержания декозагексаеновой кислоты в жирных кислотах (в)..

что между τ_{C1} и АОА в липосомах и из липидов печени, и из головного мозга существует достоверная, хотя и не очень высокая корреляция. Так как в качестве антиоксиданта в наноконплексах было использовано ЭМГ, действующим компонентом которого является эвгенол, то мы можем сравнить его эффект на τ_{C1} в липосомах из ФХ сои *in vitro* и в нашем эксперименте. Ранее нами было установлено, что ЭМГ снижало τ_{C1} липосом

из ФХ сои [34]. Аналогичный эффект мы наблюдаем и в эксперименте *in vivo* (группы 2 и 3). Таким образом, данный антиоксидант одинаково действует на структуру липосом, и его эффект не зависит от степени сложности липидного состава. Интересно отметить, что, по-видимому, это свойство эвгенола не является типичным для антиоксидантов, так как ранее нами было установлено, что такие антиоксиданты, как фенозанкалия и α -токоферол, увеличивали τ_{C1} и в биологических мембранах, и в липосомах, приготовленных из их липидов [35–36]. Необходимо отметить и такой интересный факт, как значительное увеличение τ_{C1} в липосомах из липидов печени группы 5 и липосомах из липидов головного мозга групп 4, 6 и 7, в нанолипосомы которых входил Cas-Na. Такой же эффект этого белка был зафиксирован нами и в экспериментах *in vitro* при инкапсуляции липосом в белок [34]. Однако в эксперименте *in vivo* белок присутствовал только в тех липосомах, которые были включены в диету, но не в липидных экстрактах, из которых готовились липосомы, т.е. его влияние было опосредованным.

Параметр упорядоченности в поверхностных слоях липидов S статистически достоверно возрастает по мере старения мышей в липосомах из липидов печени (группа 8 по сравнению с группой 1) и не изменяется в липосомах из липидов головного мозга. Диеты, используемые в группах 2 и 3, существенно и достоверно снижают этот показатель и в липосомах из липидов печени, и в липосомах из липидов головного мозга и не меняют его в группах 6 и 7. Достаточно хорошей корреляции между S и АОА не обнаружено, хотя ее можно было бы ожидать, так как антиоксиданты как раз встраиваются в поверхностные слои липидов [37, 38]. Можно предположить, что в значительной степени в изменение и этой характеристики, и τ_{C1} может вносить и холестерин, содержание которого может изменяться при использовании нанолипосомальных диет, а влияние на структурные изменения в мембранах зависит от его концентрации [31, 32].

Важной характеристикой липосом являются их размеры и поверхностный заряд, которые существенно зависят как от их липидного состава [39, 41], так и от включенных в них антиоксидантов [40, 41]. Мы охарактеризовали липосомы, приготовленные из липидов органов мышей всех экспериментальных групп, по показателям гидродинамического диаметра липосом (D) и ζ -потенциалу. Результаты представлены на рис. 7а.

В первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что липосомы, приготовленные из липидов головного мозга, весьма существенно (в 1.5–2.6 раза) меньше по размерам, чем липосомы из липидов печени. Вероятно, это связано с раз-

личным составом липидов в этих органах — липиды головного мозга содержат значительно больше холестерина и меньше ПНЖК [27], что приводит к более плотной и компактной структуре липосом и согласуется с нашими результатами о микровязкости и ригидности мембран из липидов головного мозга. При сопоставлении результатов о размерах липосом и структуре мембран нами было установлено, что между микровязкостью липидов и размерами липосом прямая взаимосвязь отсутствует, но она имеет место для жесткости мембран S и средним диаметром липосом вне зависимости от их происхождения (таблица). Абсолютная величина отрицательного ζ -потенциала (поверхностный заряд) липосом из липидов головного мозга на 25% выше, чем у липосом из липидов печени, что может быть связано с перераспределением отрицательно заряженных фосфолипидов на внешней и внутренней поверхностях липосом [39].

В работе [12] было установлено, что относительное содержание докозагексаеновой ПНЖК (22:6 ω 3) в жирных кислотах головного мозга мышей в два-три раза выше, чем в жирных кислотах липидов печени, при этом, как указывалось выше, липосомы из липидов головного мозга в 1.5–2.6 раза меньше по размерам; для диаметров липосом, приготовленных из липидов обоих органов, наблюдается хорошая обратная зависимость от относительного содержания докозагексаеновой кислоты в жирных кислотах (рис. 7в) с коэффициентом корреляции $R = 0.836$. Этот факт может свидетельствовать о значительном влиянии длинноцепочечной докозагексаеновой ПНЖК в формировании липосом.

Возрастные изменения приводят к тому, что гидродинамический диаметр липосом из липидов печени увеличивается в 1.7 раза, поверхностный заряд становится более отрицательным в 1.3 раза, в то время как в липосомах из липидов головного мозга гидродинамический диаметр уменьшается в 1.1 раза, а поверхностный заряд — увеличивается в 1.2 раза. Таким образом, возрастные изменения в печени и головном мозге идут в противоположных направлениях и в печени выражены более значительно. Все диеты приближали размеры и поверхностный заряд липосом к уровню, характерному для липосом из липидов органов молодых животных.

Подводя итоги работы, можно сделать следующие выводы: прием различных нанолипосомальных диет оказывает влияние на такие физико-химические свойства липидов печени и головного мозга, как их способность к окислению и микровязкость, причем изменения в окисляемости носят более однотипный характер по сравнению с изменениями в структурном состоянии липидов. Наибольшая зависимость параметров, характе-

ризующих ПОЛ и структурное состояние липидов в сложных системах переменного липидного состава, выявлена для величин $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК})$ и $\Sigma(\text{ПНЖК} + \text{МНЖК}) / \Sigma\text{НЖК}$ соответственно; размеры липосом зависят от степени упорядоченности поверхностных липидов липосом. Физико-химические свойства липидов существенно изменяются с возрастом животных, прием нанолипосомальных диет корректирует эти изменения и приближает уровень исследуемых параметров к исходному состоянию, характерному для здоровых молодых животных, диета с липосомами состава (ФХ + ЭМГ + РЖ + Cas-Na) была наиболее эффективной и может быть рекомендована для практического применения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-16-00085). В рамках работ по госбюджетному финансированию проведены исследования по окислению липосом (Н.Н. Сажина), ЭПР-спектроскопические исследования (В.В. Каспаров), исследования методом светодинамического рассеяния (Н.Н. Сажина, И.Г. Плащина).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования с применением методов ЭПР-спектроскопии и светодинамического рассеяния проведены в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. C. Candela, L. L. M. Bermejo, and K. V. Loria, *Nutric. Hospital* **26**, 323 (2011).
2. В.И. Максимов, *Пища и дегенеративные болезни* (М., Миклош, 2004).
3. ГОСТ Р 55577-2013. *Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности.*
4. M.G. Semenova and E. Dickinson, in *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions* (Brill, Leiden, Boston, 2010).
5. D. J. McClements, *Nanoparticle- and Microparticle-based delivery systems. Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds* (Taylor & Francis Group, London, New York, 2015).
6. M. G. Semenova, A. S. Antipova, D. V. Zelikina, et al., *Food Res. Int.* **88**, 70 (2016).
7. M. G. Semenova, D. V. Zelikina, A. S. Antipova, et al., *Food Hydrocolloids* **52**, 144 (2016).

8. Н. Н. Сажина, А. С. Антипова, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Биоорганическая химия* **45**, 193 (2019).
9. Е. И. Мартиросова, М. Г. Семёнова, А. С. Антипова и др., *Химическая физика* **38** (12), 38 (2019).
10. М. Г. Семенова, А. С. Антипова, М. С. Анюхина, et al., *Food & Function* **3**, 271 (2012).
11. М. Г. Семенова, А. С. Антипова, Л. Е. Белякова, et al., *Food Hydrocolloids* **42**, 149 (2014).
12. Н. П. Пальмина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова и др., *Прикладная биохимия и микробиология* **57** (2), 179 (2021).
13. Н. Н. Сажина, М. Г. Семенова, А. С. Антипова и др., *Биофизика* **65** (4), 760 (2020).
14. L. Mainali, M. Raguz, W. J. O'Brien, and W. K. Subczynski, *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 1432 (2013).
15. M. Raguz, J. Widomska, J. Dillon, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2380 (2009).
16. T. G. Blaigh and W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
17. М. Кейтс, *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов* (Мир, М., 1975).
18. E. Niki, *Methods Enzymol.* **186**, 100 (1990).
19. А. Н. Кузнецов, *Метод спинного зонда* (Наука, М., 1976).
20. I. Pinchuk and D. Lichtenberg, *Chem. Phys. Lipids* **178**, 63 (2014).
21. P. A. C. McPherson, A. Bole, K. A. Cruz, et al., *Chem. Phys. Lipids* **165**, 682 (2020).
22. C. Lee, J. Barnett, and P. D. Reven, *J. Lipid Res.* **39**, 1239 (1998).
23. Е. Б. Бурлакова и Н. Г. Храпова, *Успехи химии* **54** (9), 907 (1985).
24. E. Niki, *Biomed J.* **37**, 106 (2014).
25. Е. Б. Бурлакова и Н. П. Пальмина, *Вестн. АМН СССР* **3**, 1 (1982).
26. E. B. Burlakova, N. P. Palma, and E. L. Maltseva, in *Membrane Lipid Oxidation*, Ed. by C. Vigo-Perfley (CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1991), Vol. 3, pp. 209–238.
27. P. Subramanian, S. Mirunalini, S. R. Pandi-Perumal, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **571**, 116 (2007).
28. D. Chapman, in *Biological Membranes*, Ed. by D. Chapman (Acad. Press, Lond., 1982), Vol. 4, pp. 179–229.
29. D. Chapman and G. Benga, in *Biological Membranes*, Ed. by D. Chapman (Acad. Press, Lond., 1984), Vol. 5, 1–56 (1986).
30. M. Shinitzky, in *Physiology of Membrane Fluidity*, Ed. by M. Shinitzky (CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1984), Vol. 1, pp. 1–51.
31. P. J. Quinn and C. Wolf, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 33 (2009).
32. G. W. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 47 (2009).
33. S. R. Wassall and W. Stillwell, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 24 (2009).
34. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, В. И. Бинюков и др., *Биофизика* **63** (1), 78 (2018).
35. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева и Т. Е. Часовская, *Биофизика* **59** (4), 704 (2014).
36. Т. Е. Часовская, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, *Биофизика* **58** (1), 97 (2013).
37. В. В. Белов, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, *Биофизика* **56** (2), 372 (2011).
38. Т. Е. Часовская, И. Г. Плащина и Н. П. Пальмина, *Докл. РАН* **449** (6), 673 (2013).
39. M. Mosca, A. Cerlie, and L. Ambrosone, *Chem. Phys. Lipids* **164**, 158 (2011).
40. S. Azouzi, H. Santuz, S. Vorandat, et al., *Biophys. J.* **112**, 1863 (2017).
41. Н. Н. Сажина, И. Г. Плащина, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Коллоид. журн.* **82**, 89 (2020).

Physicochemical Properties of Liposomes Made from Lipids of Liver and Brain of Mice Receiving Nanolipid Complexes

N.P. Palma, N.N. Sazhina, N.G. Bogdanova, A.S. Antipova, E.I. Martirosova, I. G. Plashchina, V.V. Kasparov, and M.G. Semenova

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

The physicochemical properties of lipids of the most important organs (liver and brain) of mice that received nanoliposomal complexes of different compositions in a long-term diet (3 months) were studied. The components of nanoliposomal complexes included: soy phosphatidylcholine, clove essential oil, fish oil and sodium caseinate. Liposomes were prepared by mixing lipids from the investigated organs and checked whether they were able to initiate oxidation. The structure of the lipid bilayer in regions of the localization of 5-doxyl and 16-doxyl stearic acids spin probes, and the size and charge of liposomes were also determined. It was found that all the studied parameters changed significantly with the age of the animals: lipids from both organs had a reduced capacity for oxidation; microviscosity decreased and cells enlarged; the size of liposomes from liver lipids increased while the size of liposomes from brain lipids decreased; after diet feeding, the studied values of mice were closer to those typical of young animals. Correlation was found between the rate of lipid oxidation and microviscosity upon changing fatty acid composition, and liposome size was correlated with the parameter showing how lipid layers arrange themselves over the membrane surface.

Keywords: liposomes, lipid oxidative capacity, membrane structure, diameter and charge of liposomes