УДК 541.128.3+542.924+547.535-39

ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ И ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ С ВКЛЮЧЕННЫМИ НУТРИЦЕВТИКАМИ В ПРОЦЕССЕ ИХ ИНИЦИИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ

© 2020 г. Н. Н. Сажина^{1, *}, И. Г. Плащина¹, М. Г. Семенова¹, Н. П. Пальмина¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия *e-mail: Natnik48s@yandex.ru Поступила в редакцию 21.03.2019 г. После доработки 04.07.2019 г. Принята к публикации 12.07.2019 г.

Липосомы из фосфатидилхолина (PC) широко используются как модель биомембран живых клеток для изучения в них различных биохимических процессов. в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ), и воздействия на окисление различных веществ. В работе методом динамического рассеяния света исследована динамика изменения размеров и С-потенциала липосом из соевого РС в процессе их инициированного 2.2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлоридом окисления при температуре 37°С. Изучено влияние на эти параметры включения в липосомы α-линоленовой кислоты и эфирного масла гвоздики, а также капсулирования липосом казеинатом натрия. Установлено, что в процессе окисления средний размер РС-липосом увеличивается на 6–7%, однако корреляции между их размером и накоплением продуктов ПОЛ не наблюдается. Абсолютное значение отрицательного ζ-потенциала возрастает к концу окисления в 3 раза. Включение в липосомы α-линоленовой кислоты значительно изменяет динамику изменения их размеров и ζ -потенциала. Присутствие в липосомах эфирного масла гвоздики снижает накопление диеновых конъюгатов в процессе окисления и стабилизирует размеры и ζ-потенциал к концу окисления и для исходных липосом, и для липосом с *α*-линоленовой кислотой. Капсулирование липосом казеинатом натрия приводит к стабильности размеров и ζ-потенциала образующихся комплексных структур в ходе окисления.

DOI: 10.31857/S0023291220010152

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время липосомы из фосфатидилхолина (РС) широко используются в качестве моделей биомембран для изучения в них различных биохимических процессов, в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ), и воздействия на этот процесс различными субстанциями [1]. Процессы ПОЛ, при которых образуются свободные радикалы, пероксиды и другие промежуточные интермедиаты, влияют на многие свойства и функции мембраны клетки, поскольку изменяются состав и структурное состояние липидов мембран. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) фосфолипидов мембран подвергаются значительной модификации в процессе окисления, что приводит к деградации ацильных цепей фосфолипидов. Изменяются физико-химические свойства мембран (текучесть, проницаемость, активность протеинов и др.) и их важные функции, что приводит к старению клеток и появлению различных заболеваний [2, 3].

На кинетику ПОЛ в липосомах существенно влияет структура ее липидных компонентов и их способность к агрегированию, что может приводить к изменению размеров и дзета-потенциала (поверхностного заряда) липосом в процессе ПОЛ [4]. В свою очередь, изменения заряда липосом могут влиять на кинетику их окисления [5, 6]. Различные вещества, влияющие на ПОЛ, также могут изменять структуру, размеры и ζ-потенциал липосом. Поэтому, изучая кинетику инициированного окисления липосом по накоплению первичных продуктов окисления (диеновых конъюгатов — $\mathbf{\Pi}\mathbf{K}$), вводя в липосомы ингибирующие и усиливающие ПОЛ агенты, определяя одновременно их размеры и ζ-потенциал, можно определить эффективность действия этих агентов и их влияние на физико-химические параметры липосом в процессе окисления.

Была выполнена серия работ [7-11] по исследованию воздействия различных растительных антиоксидантов (АО) на автоокисление липосом из соевого РС, в том числе содержащих альфа-линоленовую кислоту (ALA), при температуре 25°С. Установлено, что наибольшую ингибирующую активность проявляет эфирное масло гвоздики (ЭМГ) [10]. Помимо АО для защиты РС-липосом от окисления использовали их капсулирование различными биополимерами, в частности казеинатом натрия (Cas-Na) [7-9], что не только предохраняет липосомы от окисления, но и повышает их функциональность и растворимость в водной среде. Методом динамического рассеяния света (ДРС) были определены размеры и **С-потенциал липосом в присутствии указанных** веществ при комнатной температуре.

В [12] в продолжение этих работ были исследованы кинетика инициированного 2.2'-азобис (амидинопропан) дигидрохлоридом (**AAPH**) окисления липосом из соевого PC, в том числе в присутствии ALA, при температуре 37 и 60°С и ингибирование окисления этих липосом включением в них ЭМГ и путем капсулирования с помощью Cas-Na. В процессе окисления также определяли средний размер и ζ -потенциал липосом. Целесообразно было установить взаимосвязь между изменениями этих параметров и увеличением концентрации ДК в ходе окисления, а также изучить влияние на этот процесс веществ, ингибирующих и усиливающих окисление.

Аналогичное исследование изменения размеров и С-потенциала липосом из соевого лецитина при их инициированном ААРН окислении при $T = 40^{\circ}$ С в течение 28 ч было выполнено в работе [13] при изучении влияния состава липосом на ПОЛ. В качестве добавок в липосомы использовали холестерин, стеарат холестерина и их смесь. Параллельно наблюдали за размерами и ζ-потенциалом липосом, не подвергавшихся окислению (хранившихся при 40°С). В течение времени наблюдения размеры и ζ-потенциал таких "контрольных" липосом изменялись незначительно (в пределах ошибки измерений), в то время как окисляющихся липосом разного состава – достаточно сильно. При этом если изменение размеров зависело от ингибирующего действия добавок, то существенное (до 10 раз) увеличение отрицательных значений ζ-потенциала к концу окисления наблюдалось для всех липосомальных композиций. По мнению авторов [13], это обусловлено изменениями при окислении конфигурации отрицательно заряженных полярных головных групп молекул фосфолипида и, как следствие, их ориентации вблизи поверхности бислойной мембраны. Корреляцию изменения размеров и ζ-потенциала липосом с накоплением продуктов ПОЛ в этой работе не отслеживали.

В настоящей работе измерены размеры и ζ-потенциал липосом из соевого PC в процессе их ААРН-инициированного окисления при 37°C с целью установления корреляции этих параметров с концентрацией продуктов ПОЛ (ДК). Другой целью было исследование влияния присутствия АLA и ЭМГ и капсулирования липосом с помощью Cas-Na на динамику изменения их размеров и ζ-потенциала в процессе окисления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого PC марки Lipoid S100 (Lipoid GmbH, Германия) в фосфатном буфере с pH 7.2 и ионной силой 1 мМ. Содержание фосфолипидов в Lipoid S100 по данным производителя следующее (г/100 г): PC – 94.0, N-ацилфосфатидилэтаноламин – 0.5, фосфатидилэтаноламин – 0.1, фосфатидилинозитол – 0.1, лизофосфатидилхолин – 3.0. Кроме того, он содержит неполярные липиды в количестве (г/100 г): триглицериды – 2.0, свободные жирные кислоты – 0.5, α-токоферол – 0.15. Состав жирных кислот (в % от общего их количества): пальмитиновая – 12–17, стеариновая – 2–5, олеиновая – 11–15, линолевая – 59–70, линоленовая – 3–7.

Дисперсию липосом с концентрацией 1 мг/мл готовили из суспензии PC, добавляя в нее, если необходимо, ЭМГ (4.0 мас. % от PC) или ALA в пропорции PC : ALA = 1 : 0.59 для достижения в липосомах соотношения α -линоленовой и линолевой кислот (ω -3 : ω -6), равного 1 : 1 с учетом жирнокислотного состава PC Lipoid S100. Липосомы формировали с помощью ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США), охлаждая их смесью воды со льдом для предотвращения окисления, после чего пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экструдер (Avanti Polar Lipids, США).

Капсулирование РС-липосом с помощью Cas-Na (Sigma, Новая Зеландия) осуществляли согласно методике [8, 9] при весовом соотношении Cas-Na : PC = 10 : 1 и концентрации PC 1 мг/мл. Природный биополимер Cas-Na является мицеллообразующей натриевой формой основного белка молока, в состав которого входят такие индивидуальные белки как α_{s_1} -, α_{s_2} -, β - и к-казеины. Cas-Na растворяли в том же фосфатном буфере (рН 7.2, ионная сила 1 мМ) на магнитной мешалке, затем раствор центрифугировали (30 мин, 4000 об./мин) для удаления примесей. Низкая ионная сила буфера была выбрана для того, чтобы при капсулировании задействовать электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами белка и липидов [8, 9]. Концентрацию белка в растворе определяли методом дифференциальной рефрактометрии по известному значению его инкремента показателя преломления. Растворы Cas-Na и PC-липосом в фосфатном буфере смешивали в шейкере (GFL 3032, Германия) в течение 1 ч при 40°С.

Окисление липосом инициировали водорастворимым азоинициатором ААРН; его концентрация в дисперсии липосом составляла 2 мМ. Окисление проводили в пробирках, помещенных в термостат, при температуре 37°С, из которых периодически отбирали пробы дисперсии для измерения размеров и ζ -потенциала липосом. Степень развития ПОЛ во времени оценивали по УФ-спектрам поглощения ДК при $\lambda = 233$ нм на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer). Ошибка измерения оптической плотности (*A*) составляла не более 3%. Погрешность определения разности $A - A_0$ (A_0 – значение A в момент времени t = 0) не превышала $\pm 10\%$.

Для определения размеров липосом использовали метод ДРС. В этом методе проводится расчет гидродинамического диаметра $(D_{\rm h})$ сфер, которые двигались бы в жидкости с той же скоростью, что и исследуемые частицы. Измерения D_h проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм, рассеянного на липосомах под углом 173°. Концентрация РС-липосом составляла 1 мг/мл, температура 25°С, индекс полидисперсности (PdI) липосом изменялся в пределах 0.1-0.3. Для каждого размера D_h регистрировали 5-10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями при каждом измерении; усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Так как каждый опыт по окислению повторяли 3 раза, то учитывались также ошибки при повторных измерениях D_h. Суммарная погрешность не превышала $\pm 5\%$. На рис. 1 приведен пример распределений интенсивности рассеянного излучения (I) по размерам липосом состава PC + ALA в разные моменты времени окисления.

Для измерения ζ -потенциала липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц. Калибровку проводили по стандартной дисперсии полистирольного латекса с погрешностью $\pm 5\%$. Для всех изученных образцов липосомальных дисперсий спектр подвижности содержал только одну полосу. Усреднение максимальных значений ζ осуществлялось по результатам трех измерений, воспроизводимость для идентичных образцов различалась в разные моменты времени окисления, но была в пределах 10%. С учетом погрешности калибровки прибора, суммарная ошибка измерений ζ не превышала $\pm 12\%$. Интенсивность светорассеяния, %



Рис. 1. Изменения распределений интенсивности светорассеяния (*I*) по размерам липосом ($D_{\rm h}$) для смеси PC + ALA в процессе инициированного окисления: *I* – без ААРН (PdI = 0.197), *2* – в присутствии ААРН при *t* = 0 мин (PdI = 0.170), *3* – *t* = 30 мин (PdI = 0.113), *t* = 360 мин (PdI = 0.123).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось выше, в [12] проведено детальное исследование инициированного ААРН окисления липосом соевого РС с некоторыми нутрицевтиками при разной температуре и даны оценки кинетических параметров окисления. В настоящей работе мы приводим данные по изменению значений $D_{\rm h}$ и ζ в процессе окисления при температуре 37°С 5-ти видов липосом: исходных PC-липосом, а также содержащих ЭМГ, ALA или их смесь и липосом, капсулированных Cas-Na. Для объяснения динамики изменений $D_{\rm h}$ и ζ липосом в процессе окисления и влияния на этот процесс накопления ДК и присутствия указанных добавок, на рис. 2 приведены соответствующие кинетические кривые изменения оптической плотности ДК в процессе окисления, взятые из [12]. Как было показано в этой работе, при автоокислении РС-липосом при 37°С период индукции составил порядка 300 мин, и вплоть до 600 мин отмечалось лишь незначительное повышение уровня ДК (менее 10% по сравнению с уровнем ДК для инициированного окисления при этой температуре). Поэтому измерения размера и С-потенциала липосом в процессе автоокисления в этот период времени мы не проводили, считая, что изменения этих параметров будут незначительными.

При инициированном окислении РС-липосом имеет место заметная задержка начала этого процесса (рис. 2, кривая *I*). Период индукции (примерно 30 мин) обусловлен не только кинетикой развития процесса накопления ДК [5], но и ингибирующим действием α-токоферола в ис-



Рис. 2. Изменение оптической плотности ДК в процессе инициированного окисления липосом разного состава: 1 - PC-липосомы, $2 - c \ ЭМГ (PC : <math>\Im M\Gamma = 1 : : 0.04)$, $3 - c \ ALA (PC : ALA = 1 : 0.59)$, $4 - c \ ALA u \ ЭМГ (PC : ALA : <math>\Im M\Gamma = 1 : 0.59 : 0.04)$, $5 - c \ Cas-Na (PC : Cas-Na = 1 : 10)$. [PC] = [PC + $\Im M\Gamma$] = [PC + ALA] = [PC + ALA + $\Im M\Gamma$] = 1 мг/мл, [AAPH] = 2 мМ, $T = 37^{\circ}C. A -$ оптическая плотность ДК при $\lambda = 233$ нм, A_0 – то же при t = 0.

пользуемом РС. При введении в липосомы 4 мас. % ЭМГ (кривая 2) в течение 180 мин имеет место полное торможение окисления РС, а в момент максимального накопления ДК его концентрация в присутствии ЭМГ меньше примерно в 8 раз (на 87.5%). Такое сильное ингибирование окисления ПНЖК в липосомах происходит, главным образом, благодаря высокому (до 85%) содержанию в ЭМГ эвгенола (4-аллил-2-метоксифенола) очень активного жирорастворимого АО [12]. Окисление липосом, содержащих примерно 37% ALA (кривая 3), идет с большим ускорением на начальной стадии процесса (в первые 30-40 мин) и без периода индукции. Далее накопление ДК происходит медленнее, в соответствии с относительным содержанием РС в исходных и включающих ALA липосомах. Введение ЭМГ в окисляемую смесь PC + ALA повышает эффективность ингибирования окисления (кривая 4) практически в 4 раза (на 73%) и в 2 раза уменьшает период

Таблица 1. Гидродинамический диаметр (D_h) , индекс полидисперсности (PdI) и дзета-потенциал (ζ) липосом до окисления (перед введением инициатора ААРН)

Состав липосом	$D_{\rm h}$, нм	PdI	ζ, мВ
PC	150.7 ± 4.9	0.227 ± 0.012	-23.1 ± 2.2
$PC + \Im M\Gamma$	153.2 ± 1.8	0.247 ± 0.009	-14.8 ± 1.4
PC + ALA	187.2 ± 4.2	0.197 ± 0.005	-38.6 ± 3.5
$PC + ALA + \Im M\Gamma$	201.3 ± 3.6	0.201 ± 0.009	-32.8 ± 3.2
PC + Cas-Na	204.4 ± 6.3	0.270 ± 0.014	-15.4 ± 0.8

индукции, вероятно, за счет очень активного окисления ALA. Использование Cas-Na в качестве оболочки для PC-липосом снижает максимальный уровень ДК примерно в 3.5 раза (на 70%) (сравните кривые 5 и 1), слабо влияя на период индукции.

В табл. 1 приведены значения $D_{\rm h}$, PdI и ζ для липосом различного состава, измеренные до их окисления. Видно, что введение в липосомы добавок или их капсулирование Cas-Na изменяет $D_{\rm h}$ липосом и их заряд. В случае ЭМГ, по-видимому, молекулы липофильного эвгенола и других компонентов встраиваются в липидные области бислоев, нарушая их регулярную упаковку, что может приводить к небольшому увеличению $D_{\rm h}$. Подобный эффект наблюдали [14, 15] для ресвератрола и серотонина. При встраивании в липосомы молекул ALA, карбоксильные группы которых заряжены отрицательно и обращены к водной фазе, существенно увеличиваются абсолютная величина ζ (отрицательный поверхностный заряд) липосом и их средний размер. Эти данные можно сравнить с полученными ранее [8, 9] результатами измерения среднего гидродинамического радиуса $R_{\rm h}$ PC-липосом (65 нм) и (PC + + ALA)-липосом (58 нм). Для ζ-потенциала соответствующие значения составили соответственно —24 и —40 мВ. Отличие размеров указанных липосом от приведенных в табл. 1 связано, вероятно, с разными условиями приготовления и хранения дисперсий липосом и режимами их "озвучивания" [8, 12]. Значения ζ для них отличаются от табличных величин незначительно. Добавление в (PC + ALA)-липосомы ЭМГ приводит к небольшому увеличению их $D_{\rm h}$ и уменьшению абсолютного значения ζ. При капсулировании РС-липосом Cas-Na, естественно, увеличивается размер образующихся частиц. При этом абсолютное значение их отрицательного ζ-потенциала уменьшается по сравнению с ζ-потенциалом исходных РС-липосом, по-видимому, за счет компенсации отрицательного заряда ближайшими к липосоме положительно заряженными группами белковой оболочки.

На рис. 3 и 4 приведены кривые, характеризующие изменения соответственно среднего размера и ζ -потенциала исходных РС-липосом (1), содержащих добавки (2–4) и капсулированных с помощью Cas-Na (5) в процессе их инициированного окисления. Сразу после введения инициатора ААРН в дисперсию липосом (при t = 0), значения их D_h и ζ изменяются. Так как молекулы ААРН (RN=NR) заряжены положительно [16], то, попадая в липосомы, они частично нейтрализуют их поверхностный отрицательный заряд, поэтому абсолютная величина ζ для всех изученных липосом уменьшается. Вследствие этого, вероятно, происходит перестройка фосфолипидов



Рис. 3. Динамика изменения среднего гидродинамического диаметра (D_h) липосом разного состава в процессе их инициированного окисления. Состав липосом и условия их окисления смотрите в подписи к рис. 2.

в бислое, и размер липосом уменьшается (рис. 3, t = 0). Особенно это выражено для липосом состава PC + ALA (кривые 3, 4 на рис. 3, t = 0).

При термораспаде азоинициатора, генерации свободных радикалов (R[•]) и быстрого образования пероксильных радикалов ROO[•] инициатора. происходит окисление ПНЖК в липосомах, их частичная трансформация из cis в trans-cis и transtrans изомерные первичные гидропероксидные продукты окисления (ДК) [17, 18]. Авторы обзора [17], анализируя данные разных работ, сделали вывод, что в процессе ПОЛ в липосомах из яичного лецитина образуются, в основном, transtrans, a не trans-cis гидроперекиси. Эти трансформации конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов приводят к важным изменениям в структуре липосомальной мембраны и, как следствие, размера и ζ-потенциала липосом. Для РС-липосом D_h увеличивается примерно на 6-7% после 100—120 мин окисления (рис. 3, кривая *1*). К этому времени ζ возрастает по абсолютной величине с –5 до –12 мВ, достигая концу окисления -16 мВ (рис. 4, кривая *1*), подобно росту отрицательного ζ-потенциала, наблюдавшемуся в [13]. Отметим, что ход кривой 1 на рис. 4 напоминает зеркальное отображение хода кривой 1 на рис. 2, т.е. изменение ζ-потенциала коррелирует с изменением содержания ДК.

Так как взаимодействие фосфолипидных молекул в бислое липосом изменяется в процессе окисления, изменяется и ориентация их полярных головных групп [13]. Окисленные ненасыщенные жирнокислотные цепи фосфолипидов изгибаются, и их ООН-группы приближаются к поверхности липосомы [21]. Происходящие структурные изменения могут способствовать



Рис. 4. Изменение ζ-потенциала липосом разного состава в процессе их инициированного окисления. Состав липосом и условия их окисления смотрите в подписи к рис. 2.

диссоциации этих групп, что является основной причиной увеличения отрицательного заряда на поверхности липосом. При этом при таких концентрациях ДК общий объем трансформированных окисленных фосфолипидов увеличивается мало, и средний размер липосом остается практически постоянным. Это свидетельствует о том, что при физиологической температуре при таких уровнях ДК в процессе окисления размеры липосом изменяются незначительно и зависимости (корреляции) размера от концентрации ДК не наблюдается.

Дополнительные наши эксперименты показали, что при температуре 60°С, когда содержание ДК увеличилось в 3 раза к концу наблюдения по сравнению с окислением при 37°С [12], средний размер липосом немонотонно повышался и достиг 260 \pm 60 нм, что примерно на 30% выше исходного значения; ζ -потенциал при этом составил –27 \pm 2 мВ. Это может свидетельствовать об образовании в процессе окисления при таких условиях, кроме ДК, липидных конгломератов различного размера.

Присутствие в РС-липосомах ЭМГ (рис. 4, кривая 2) существенно замедляет рост абсолютной величины отрицательного ζ -потенциала липосом в течение примерно 120 мин окисления, после чего она возрастает, не достигая, однако, значения, характерного для исходных липосом. При этом размер липосом в течение всего времени окисления практически не изменяется (рис. 3, кривая 2).

Размер липосом состава PC + ALA в течение первых 30–40 мин окисления уменьшается с 170 до 150 нм, а абсолютное значение ζ -потенциала с -15 до -10 мВ (кривые *3* на рис. 3, 4). Это время практически совпадает со временем полного окисления ALA, а далее продолжается окисление ПНЖК в оставшемся PC. В процессе дальнейшего окисления липосом происходит значительное (до 220 нм) увеличение их размера, вероятно, не только из-за постепенного накопления ДК, но и за счет образования конгломератов ДК с остатками окисленных молекул ALA. При этом ζ-потенциал практически не изменяется.

Присутствие в (PC + ALA)-липосомах ЭМГ сильно ингибирует окисление ALA в течение примерно 100 мин, а значения D_h и ζ почти не изменяются в процессе дальнейшего окисления липосом (кривые 4 на рис. 3, 4).

Как уже упоминалось ранее, при окислении липосом и наработке гидроперекисей в гидрофобных жирнокислотных цепях РС появляются гидрофильные перекисные группы, что приводит к перестройке структуры бислоя [18, 19].

В работе [18] методом малоуглового рентгеновского рассеяния проведена оценка изменений толщины и структуры бислоя больших моноламелярных везикул и места локализации гидропероксидных и карбоксильных групп при различных соотношениях в бислое фосфолипида РОРС (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и двух его окисленных форм – РОРС-ООН и Раге-PC (1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocoline). Было установлено, что 95% гидроперекисных групп находятся в полярной области бислойной мембраны, вблизи карбонильных групп практически при всех соотношениях этих фосфолипидов. Средняя площадь в расчете на молекулу постепенно увеличивается от 65 Å² для бислоев РОРС до 78 $Å^2$ для бислоев РОРС-ООН, в то время как толщина окисленной мембраны становится меньше, чем неокисленной.

Авторы работы [19] с использованием пирена в качестве флуоресцентного зонда и методом ДРС наблюдали фазовые изменения и агрегацию липидов в смесях DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) с окисленным PGPC (1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine) при $T = 5-60^{\circ}$ С. Полученные результаты свидетельствуют о том, что PGPC формируют крупные агрегаты из мелких мицелл, а жидкофазный DPPC при $T = 50 - 60^{\circ}$ С образует везикулы — индивидуальные и содержащие PGPC. Размер этих везикул зависит от соотношения PGPC/DPPC и температуры. DOPC и PGPC не смешиваются в жидком бислое ни в каких соотношениях, но смеси DOPC, DPPC и PGPC при некоторых их соотношениях могут формировать агрегаты DOPC + + РСРС [19] в гелевой фазе. Таким образом, в нашем случае при окислении смеси PC + ALA при сложном составе РС возможно образование различных, изменяющихся во времени агрегатов из смеси окисленных и не окисленных молекул РС, остатков ALA и интермедиатов, приводящее к

увеличению среднего размера липосом, уменьшению и стабилизации абсолютной величины их отрицательного ζ-потенциала.

Размер РС-липосом, капсулированных с помощью Cas-Na, остается практически на начальном уровне (190 нм) в течение всего процесса окисления (рис. 3, кривая 5) за счет эффективного ингибирования окисления белковой оболочкой, несмотря на накопление некоторого количества ДК (рис. 2, кривая 5). Величина ζ таких "капсул" немного уменьшается в начале окисления, а далее остается на уровне –10 мВ до конца окисления (рис. 4, кривая 5). Таким образом, белковая оболочка из Cas-Na не только заметно предохраняет ПНЖК фосфолипидов липосомы от окисления, но и стабилизирует размер и ζ -потенциал этой липосомно-белковой структуры.

В работе [20] методом калориметрии смешения был установлен преобладающий вклад электростатического взаимодействия между Cas-Na и РС-липосомами в формировании ими комплексных частиц в нейтральной области рН. На основании данных о таких структурных параметрах как молекулярная масса, размер, форма и плотность [9, 11], был сделан вывод, что "комплексы" Cas-Na с PC-липосомами представляют собой супрамолекулярные частицы с плотной структурой. Формирование таких частиц, по-видимому, существенно препятствует диффузии кислорода к ненасыщенным углеродным связям ПНЖК в липосомах и, как следствие, их окислению. Это и приводит к стабилизации размеров и С-потенциала комплексных частиц в процессе окисления.

В недавно вышедшей работе [21] исследована роль различных форм окисленных фосфолипидов в образовании рафтов (микродоменов) при тщательном контроле состава мембран. Авторы использовали флуоресцентную микроскопию гигантских моноламелярных везикул, позволяющую визуализировать воздействие гидропероксидов на структуру липидов мембран. При окислении липосом в гидрофобных жирнокислотных "хвостах" РС появляются гидрофильные перекисные группы, которые переориентируются в пространстве, что приводит к изменению конфигурации молекул фосфолипидов, увеличению их молекулярного объема и, как следствие, к изменению размера и заряда липосом. В [21] приведены схемы, наглядно иллюстрирующие изменения формы и занимаемого объема для молекул РОРС и двух его окисленных видов: РОРСООН и РагеРС. Если молекулы РОРС и РОРСООН имеют форму цилиндра, правда, разного диаметра и разной длины, что способствует формированию рафтов, то молекула PazePC имеет форму конуса, что приводит к разупорядочению двумерной структуры липосомальной мембраны. Таким образом, изменения структуры бислоя мембраны в процессе окисления могут прояснить сложные процессы, протекающие в биомембранах *in vivo*.

выводы

Изучена динамика изменения размеров и ζ-потенциала липосом из соевого PC в процессе их инициированного 2.2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлоридом окисления при температуре 37°С. Исследовано влияние на эти параметры введения в липосомы ALA и ЭМГ, а также капсулирования их Cas-Na.

Установлено, что в процессе окисления размер PC-липосом увеличивается на 6-7% и не коррелирует с изменением уровня диеновых конъюгатов. Абсолютное значение отрицательного ζ-потенциала липосом увеличивается к концу окисления примерно в 3 раза в соответствии с увеличением содержания ДК.

Введение в липосомы ALA значительно влияет на динамику изменения их размеров и ζ-потенциала: средний диаметр увеличивается примерно на 30% к концу окисления, а абсолютные значения отрицательного ζ-потенциала уменьшаются. Присутствие в липосомах ЭМГ изменяет эти закономерности и стабилизирует размеры и ζ-потенциал при окислении и исходных, и содержащих ALA PC-липосом. Капсулирование PC-липосом с помощью Cas-Na существенно снижает накопление ДК в процессе окисления, и, как следствие, размер и ζ-потенциал таких супрамолекулярных структур практически не изменяются.

Можно сделать вывод, что вариации ζ-потенциала и размеров липосом при окислении определяются, главным образом, изменением конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипида и перегруппировкой полярных головных групп его молекул. Ингибирующие окисление агенты препятствуют изменениям этих параметров в процессе окисления.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Thomas A.H., Catala A., Vignoni M. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1858. P. 139.
- Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A. // J. Gerontol. A. Biol. Med. Sci. 2004. V. 59. P. 478.

КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ том 82 № 1 2020

- 3. Spiteller G. // Med. Hypotheses. 2003. V. 60. P. 69.
- Soto-Arriaza M.A., Sotomayor C.P., Lissi E.A. // J. Colloid Interface Sci. 2008. V. 323. P. 79.
- Pinchuk I., Lichtenberg D. // Chem. Phys. Lipids. 2014. V. 178. P. 63.
- Gal S., Pinchuk I., Lichtenberg D. // Chem. Phys. Lipids. 2003. V. 126. P. 95.
- Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V., Moiseenko D.V. // Food Hydrocoll. 2014. V. 42. P. 149.
- Semenova M.G., Antipova A.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Plashchina I.G., Palmina N.P., Binyukov V.I., Bogdanova N.G., Kasparov V.V., Shumilina E.A., Ozerova N. // Food Res. Int. 2016. V. 88. P. 70.
- Semenova M.G., Zelikina D.V., Antipova A.S., Martirosova E.I., Grigorovich N.V., Obushaeva R.A., Shumilina E.A., Ozerova N.S., Palmina N.P., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Bogdanova N.G., Krivandin F.V. // Food Hydrocoll. 2016. V. 52. P. 144.
- Semenova M.G., Antipova A.S., Misharina T.A., Alinkina E.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Palmina N.P., Binyukov V.I., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Ozerova N.S., Shumilina E.A., Baeva K.A., Bogdanova N.G. // Gums and Stabilisers for the Food Industry 18: Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions. Ed. by Williams P.A. and Phillips G. Cambridge: Royal Soc. Chem., 2016. P. 182.
- 11. Semenova M.G. // Food Hydrocoll. 2017. V. 68. P. 114.
- 12. Sazhina N.N., Antipova A.S., Semenova M.G., Palmina N.P. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 34.
- Mosca M., Cerlie A., Ambrosone L. // Chem. Phys. Lipids. 2011. V. 164. P. 158.
- 14. Neves A.R., Nunes C., Amenitsch H., Reis S. // Soft Matter. 2016. V. 12. P. 2118.
- Azouzi S., Santuz H., Vorandat S., Pereira C., Cote F., Hermine O., Kirat K.E., Colin Y., Kim C., Etchebest C., Amereault P. // Biophys. J. 2017. V. 112. P. 1863.
- Werber J., Wang Y.J., Milligan M., Li X., Ji J.A // J. Pharm. Sci. 2011. V. 100. P. 3307.
- Schnitzer E., Pinchuk I., Lichtenberg D. // Eur. Biophys. J. 2007. V. 36. P. 499.
- De Rosa R., Spinozzi F., Itri R. // Biochim. Biophys. Acta. 2018. V. 1860. P. 2299.
- Singh J., Ranganathan R. // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2015. V. 1848. P. 1472.
- Istarova T.A., Semenova M.G., Sorokoumova G.M., Selishcheva A.A., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anokhina M.S. // Food Hydrocoll. 2005. V. 19. P. 429.
- Tsubone T.M., Junqueira H.C., Baptista M.S., Itri R. // Biochem. Biophys. Acta – Biomembr. 2019. V. 1861. P. 660.