

НАНОБИОМЕДИЦИНА  
И НАНОФАРМАЦЕВТИКА

УДК 615.324

ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЭФИРЫ ПРИРОДНОГО  
АНТИОКСИДАНТА АСТАКСАНТИНА, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ  
ПЛЮРОНИКОМ F68 ИЛИ DSPE-PEG 2000

© 2024 г. Н. С. Марченкова<sup>1</sup>, К. Е. Баркар<sup>1</sup>, Е. А. Куликов<sup>2,\*</sup>, К. С. Плохих<sup>2</sup>,  
Н. Ю. Лотош<sup>2</sup>, А. А. Селищева<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: [www.kulikov.e.a.93@mail.ru](mailto:www.kulikov.e.a.93@mail.ru)

Поступила в редакцию 13.07.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

Липосомы, содержащие природный антиоксидант – эфиры астаксантина, были приготовлены методами диспергирования липидной пленки и выпаривания из хлороформа с дальнейшей обработкой ультразвуком. Для увеличения стабильности эфиров астаксантина липосомы на основе Lipoid S75 (2 мг/мл) модифицировали плуронином F68 или пегилированным дистеарилфосфатидил-этанололамином – DSPE-PEG 2000. В результате оптимизации подобрано соотношение фосфолипида и модификаторов для стабильных липосом с концентрацией эфиров астаксантина 0.5 мг/мл. Липосомы с 0.5%-ным плуронином F68 состояли из двух фракций размером  $110 \pm 15$  и  $440 \pm 15$  нм, а липосомы с DSPE-PEG 2000 (2.5 мг/мл) имели одну фракцию со средним гидродинамическим диаметром  $255 \pm 40$  нм.  $\zeta$ -потенциалы липосом составили  $-35 \pm 15$  и  $-60 \pm 10$  мВ соответственно. При инкубации мононуклеарных клеток крови с разработанными липосомами в течение 24 ч было выявлено, что выживаемость составляет  $84 \pm 4\%$ . Показано, что липосомы с эфирами астаксантина разного состава инактивируют ABTS-радикал на 17–50% эффективнее, чем липосомы без эфиров астаксантина.

DOI: 10.56304/S1992722323601258

## ВВЕДЕНИЕ

Астаксантин (АСТ) – природный кетокаротиноид оранжево-красного цвета, который встречается у многих рыб, ракообразных, некоторых птиц и микроорганизмов [1–4]. Молекулярная структура АСТ, содержащая 11 сопряженных  $\pi$ -связей, позволяет эффективно тушить активные формы кислорода и удалять радикалы [5–7]. АСТ может существовать в незамещенной форме, а также в виде эфиров (эфАСТ) [8]. По многим показателям АСТ считается сильнейшим антиоксидантом среди всех каротиноидов [9–11], причем эфАСТ в опытах *in vitro* показывают лучший эффект, чем незамещенная форма [12, 13]. За последние десятилетия АСТ набрал популярность благодаря широкому спектру своей биологической активности [14–18].

АСТ может блокировать окисление липопротеина низкой плотности [19], улучшать липидный обмен, оптимизируя уровень липидов и адипоктина, а также снижать уровень воспаления [20, 21]. АСТ благоприятно действует при воспали-

тельных заболеваниях, вызванных окислительным стрессом [22–24], может восстанавливать уровни активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза) и глутатиона и положительно влиять на профилактику лечения возрастных и нейродегенеративных заболеваний [25–28], в том числе на болезнь Альцгеймера [3, 15, 29]. АСТ легко преодолевает гематоэнцефалический барьер [30], что может использоваться для создания средств терапии нейродегенеративных заболеваний.

Однако из-за малой растворимости в воде и низкой биодоступности использование АСТ и его эфиров сильно ограничено. В связи с этим существует большое количество публикаций, посвященных разработке дисперсных форм АСТ и его эфиров: липосом [31–36], наноэмульсий [37–39]. Основной целью являлось изучение антиоксидантной или биологической активности таких систем, в то время как стабильность и концентрация включенного АСТ не имели решающего значения. Поэтому практически нет публикаций,

посвященных оптимизации липидного состава для получения стабильных дисперсных форм АСТ и его эфиров.

Известно, что липосомы интенсивно поглощаются макрофагами печени (клетками Купфера), что сокращает время их пребывания в кровотоке. Для защиты от поглощения макрофагами липосомы модифицируют введением пегелированных липидов. Модификация липосом полиэтиленгликолем позволяет им дольше циркулировать в кровотоке [40], что успешно применяется в клинических испытаниях, например доксорубин [41] или паклитаксел [42].

Модификация плурониками приводит к уменьшению скорости высвобождения нагруженного в липосомы активного вещества [43, 44]. Кроме того, плуроники способны стабилизировать Н-агрегаты АСТ [45], которые могут обладать повышенной антиоксидантной активностью [46].

Цель настоящего исследования – получение стабильных липосом с высокой концентрацией эфиров АСТ (0.5 мг/мл) и изучение их антиоксидантных свойств. Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: подобрать оптимальный состав липосом, содержащих модификаторы полоксамер P188 (Pluronic F68) или пегелированные липиды; оценить стабильность полученных липосом с учетом показателей: гидродинамического диаметра,  $\zeta$ -потенциала, а также стабильность встроенных эфиров АСТ при хранении; изучить взаимодействия катион-радикала АВТС<sup>+</sup> с липосомами, а также оценить жизнеспособности мононуклеарных клеток крови человека, инкубированных с полученными липосомами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растворители.** Хлороформ ХЧ, дихлорметан ХЧ, изопропанол ХЧ, (Химмед, Россия). В работе использовали деионизованную воду milli-Q 18.2 M $\Omega$  cm, которую получали на системе Merck (Millipore) Milli-Q Integral 10 (Merck, Германия).

**Реактивы.** Астаксантин  $\geq 97\%$  (высокоэффективная жидкостная хроматография) из *Blakeslea trispora*, эфиры астаксантина из *Haematococcus pluvialis*, Kolliphor P188 (Lutrol F68) (Sigma Aldrich, США), пегелированный дистеарилфосфатидилэтаноламин (DSPE-PEG 2000) и Lipoid S75 (Lipoid, Германия), трипановый синий (Диаэм, Россия).

**Методика получения липосом, модифицированных плуроником.** Навеску фосфолипида Lipoid S75 растворяли в хлороформе, а затем по каплям впрыскивали в горячий водный раствор плуроника (0.5–2%) (65–70°C) при интенсивном перемешивании. После испарения хлороформа смесь

обрабатывали в ультразвуковой (УЗ) ванне в течение 15 мин с периодическим встряхиванием. Образец дважды с перерывом в 1 мин подвергали воздействию УЗ-дезинтегратора Vibra Cell 75043 (Sonics & Materials, США) в режиме импульса 01 : 01 со временем активной работы 1 мин 30 с и амплитудой 40%, энергия – 0.050 Дж.

Для получения липосом с эфирами АСТ использовали упомянутую выше методику без использования УЗ-дезинтегратора на последнем этапе.

Конечная концентрация Lipoid S75 в водном растворе составляет 2 мг/мл, плуроника – от 0.1 до 5%, эфАСТ – от 0.1 до 0.5 мг/мл.

**Методика получения липосом, модифицированных пегелированными липидами.** Навески фосфолипида Lipoid S75 и пегелированного липида DSPE-PEG 2000 растворяли в хлороформе, а затем выпаривали с использованием центрифужного вакуумного концентратора Eppendorf Concentrator 5301 (Германия) до образования липидной пленки. Соотношение S75 : DSPE-PEG 2000 (М/М) подбирали в широком диапазоне от 100% S75 до 100% DSPE-PEG 2000. К липидной пленке добавляли 2 мл горячей воды (65–70°C), а затем смесь обрабатывали в УЗ-ванне в течение 15 мин с периодическим встряхиванием. Образец дважды с перерывом в 1 мин подвергали воздействию УЗ-дезинтегратора в режиме импульса 01 : 01 со временем активной работы 1 мин 30 с и амплитудой 40%, энергия – 0.05 Дж.

Для получения липосом с эфирами АСТ использовали упомянутую выше методику без использования УЗ-дезинтегратора на последнем этапе. Конечная концентрация S75 во всех образцах составила 2 мг/мл, DSPE-PEG 2000 – от 0.63 до 3.77 мг/мл, эфАСТ – от 0.1 до 1 мг/мл. Концентрация DSPE-PEG 2000 в таблицах указана в мольном соотношении к Lipoid S75, для пересчета в мг/мл можно использовать молярную массу  $M$  (DSPE-PEG 2000) = 2700 г/моль.

**Определение размеров и  $\zeta$ -потенциала липосом методом динамического рассеяния света (ДРС).** Гидродинамический диаметр ( $d$ , нм),  $\zeta$ -потенциал (мВ) и индекс полидисперсности (PDI) липосом определяли на приборе Zetasizer Nano (Malvern, Англия) методом ДРС при температуре кюветы 25°C. Размер рассчитывали в режиме измерения “по интенсивности”. Использовали следующие условия: показатель преломления был принят равным 1.590, показатель поглощения – 0.01. При определении размеров липосом для каждого образца проводили три повтора по 20 измерений в каждом.  $\zeta$ -потенциал определяли в рамках трех повторов по 12–20 измерений в каждом (максимальное число повторов могло доходить до 100 в некоторых образцах). Количество точек корреляционной функции – 30–50 точек в

каждом накоплении. Скорость счета для разных образцов находилась в диапазоне от 15000 до 200000 счетов в секунду  $\times 1000$ .

*Оценка стабильности приготовленных липосом.* Для оценки стабильности липосом измеряли размеры липосом,  $\zeta$ -потенциал и индекс полидисперсности до и после хранения в темноте при 5°C в течение одной недели. Липосомы, показавшие наилучший результат в течение недели, повторно изучали на стабильность при тех же условиях в течение одного месяца с момента приготовления.

Стабильность эфиров АСТ оценивали по изменению оптической плотности (ОП) на полосе поглощения 480 нм в день получения и спустя 7 дней хранения.

*Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ).* Для подготовки образцов использовали медные поддерживающие сетки с отверстиями в аморфной пленке углерода (Lacey C only, 01895-F, Ted Pella, США), гидрофилизированные в тлеющем разряде на установке PELCO easiGlow (Ted Pella, США) при условиях: время обработки образца – 25 с, сила тока – 0.20 мА, остаточное давление в камере – 0.26 мбар. На сетку наносили 3 мкл образца и с помощью автоматизированной системы Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) обрабатывали для удаления излишков раствора в течение 2.5 с путем двустороннего промакивания фильтровальной бумагой при влажности в камере 95–100% и температуре 4°C, затем проводили витрификацию. Образцы исследовали с помощью криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios 60-300 (Thermo Fisher Scientific, США), оборудованного устройством прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором сферических аберраций (Cs image corrector, CEOS GmbH, Германия), работающего под управлением программы EPU (Thermo Fisher Scientific, США). Основные параметры получения изображений: ускоряющее напряжение 300 кВ, номинальное увеличение  $\times 18000$ , время экспозиции 4 с, дефокусировка от –2 до –5 мкм.

*Жизнеспособность мононуклеарных клеток (МНК) крови человека* определяли при инкубировании с исследуемыми липосомами:

- S75;
- S75+ F68 0.5%;
- S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4;
- S75 + эфАСТ 0.2 мг/мл;
- S75 + F68 0.5% + эфАСТ 0.2 мг/мл;
- S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4 + эфАСТ 0.2 мг/мл.

МНК выделяли из периферической крови здоровых добровольцев в одноступенчатом градиенте плотности фикола (плотность 1.077). Клетки культивировали в 24-луночном культуральном

планшете в течение 24 ч при 37°C в атмосфере CO<sub>2</sub> (5%) в среде RPMI 1640, содержащей 2.0 мМ глутамин и 100 мкг/мл гентамицина. МНК распределяли по лункам из расчета  $4 \times 10^5$  клеток/в лунке ( $8 \times 10^5$  кл/мл) и добавляли исследуемые липосомы в количестве 50 мкл (общий объем 0.5 мл).

После инкубации клетки суспендировали и считали жизнеспособность методом окрашивания трипановым синим. 0.2%-ный раствор трипанового синего в фосфатно-солевом буфере смешивали с суспензией клеток 1 : 1, подсчет окрашенных (мертвых) клеток проводили в камере Горяева. Подсчитывали клетки в трех–пяти полях зрения, в каждом поле зрения находилось до 200 клеток.

*Определение антиоксидантной активности липосом при удалении ABTS катион-радикала.* Антиоксидантную активность полученных липосом определяли при их инкубации с радикалом 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) по методике, предложенной в [47]. Раствор ABTS<sup>•+</sup>-радикала готовили при смешивании водных растворов 1.5 мМ ABTS и 2.5 мМ K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> в соотношении 4.7 : 1 с дальнейшей инкубацией при комнатной температуре в течение 16 ч в темноте. Образовавшийся раствор темно-зеленого цвета разбавляли водой в 5 раз. К 50 мкл приготовленного раствора ABTS-радикала добавляли 50 мкл липосом. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин и регистрировали ОП при 734 нм. Все измерения были выполнены в триплетах. Процент удаления ABTS-радикала вычисляли по формуле

$$\% \text{ удаления ABTS-радикала} = [A_{\text{контроль}} - (A_{\text{образец}} - A_{\text{базовая линия}})] / A_{\text{контроль}} \times 100,$$

где  $A_{\text{контроль}}$  – поглощение раствора ABTS при 734 нм,  $A_{\text{образец}}$  – поглощение раствора ABTS с липосомами,  $A_{\text{базовая линия}}$  – поглощение базовой линии раствора ABTS с липосомами.

*Статистический анализ* проводили с помощью программ Excel (Microsoft, 2010) и STATISTICA 10 (Stat Soft, 2010). Для значений ОП ABTS<sup>•+</sup> указаны средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для липосом указаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. Статистические различия для каждой пары сравниваемых величин рассчитывали с применением алгоритма ANOVA, различия считались достоверными при величине достоверности  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение липосом, не содержащих эфиры АСТ.* Для получения липосом использовали смесь фос-

**Таблица 1.** Сравнение гидродинамических параметров пустых липосом разного состава, определенных по показателю “интенсивность”

Образец	Состав образца	После приготовления			Спустя 1 мес		
		Средний диаметр, нм ± SD	PdI	$\zeta$ , мВ	Средний диаметр, нм ± SD	PdI	$\zeta$ , мВ
1	S75 2 мг/мл	143 ± 21	0.35	-25 ± 10	122 ± 40	0.39*	-20 ± 10
2	S75 2 мг/мл + плуроник 0.5%	106 ± 15 15 ± 5	0.29	-35 ± 10	110 ± 50 33 ± 5*	$p = 0.038$ 0.37	-32 ± 8
3	S75 2 мг/мл + DSPE-PEG 2000 (10 : 4 М/М)	113 ± 8	0.37	-55 ± 20	85 ± 5* $p = 0.0005$ $p = 0.007$	0.38* $p = 0.04$	-35 ± 15

\* Достоверные отличия параметров липосом после приготовления и спустя месяц при  $p < 0.05$ .

фолипидов сои S75, состоящую из 75% фосфатидилхолина (ФХ) и 8% фосфатидилэтаноламина (ФЭ). Получение пегилированных липосом и липосом, модифицированных плуроником, проводили по методикам, которые различались первой стадией. В случае плуроника использовали медленное введение раствора хлороформа с растворенными в них липидами в водную фазу, содержащую плуроник, с последующим выпариванием растворителя (метод инъекции). В другом случае применяли классический метод выпаривания органического растворителя (хлороформа), содержащего смесь природных фосфолипидов S75 и пегилированного ФЭ, до образования липидной пленки с последующей гидратацией в водной фазе. Контролем служили немодифицированные липосомы, далее обозначаемые как “пустые” липосомы, которые не содержали эфир АСТ.

Физико-химические показатели (размер липосом,  $\zeta$ -потенциал и индекс полидисперсности) измеряли в день получения и после хранения при 5°C в темноте.

Приготовленные пустые липосомы (табл. 1) были полностью прозрачными и сохраняли свой внешний вид без изменения более двух месяцев. Образцы с плуроником содержали две фракции липосом: маленького размера (меньшая фракция, 10–70 нм) и большего (большая фракция, 100–300 нм). В табл. 1 приведены средние гидродинамические размеры, рассчитанные прибором по параметру “интенсивность”. Для повышения точности определения все липосомы разбавляли в 4 раза.

Из данных табл. 1 видно, что пустые липосомы с модифицированной поверхностью по размерам не отличаются от контроля как при получении, так и после хранения. Можно лишь отметить, что  $\zeta$ -потенциал всех липосом находился в отрица-

тельной области, причем использование модификаторов приводило к сильному снижению потенциала в случае присутствия пегилированных липидов, в которых  $\zeta$ -потенциал равнялся  $-55 \pm 20$  по сравнению с  $-25 \pm 10$  в контроле. Высокие отрицательные значения  $\zeta$ -потенциалов для липосом являются показателем устойчивого двойного электрического слоя и стабильности системы в целом.

После хранения пустых липосом в течение одного месяца при 5°C в холодильнике мелкие фракции исчезли в системах S75 2 мг/мл и S75 2 мг/мл + DSPE-PEG 2000 (10 : 4 М/М), что связано с Оствальдским созреванием. В то же время липосомы с плуроником сохранили обе фракции:  $33 \pm 5$  и  $110 \pm 50$  нм, что свидетельствует о стабилизации плуроником липосом низких размеров (табл. 1, рис. 1).

*Получение липосом с эфирами АСТ.* Известно, что АСТ и его эфиры нестабильны на свету и достаточно интенсивно подвергаются деградации и окислению [48]. Кроме того, в предварительных экспериментах было установлено, что обработка на УЗ-дезинтеграторе приводит к разрушению каротиноида. Так, после озвучивания на дезинтеграторе в течение 3 мин концентрация эфАСТ снижается на 30–40% при начальной 0.5 мг/мл и на 20–30% при начальной 0.2 мг/мл. Поэтому предприняли попытку получить липосомы не более 200 нм, содержащие модификаторы и эфиры АСТ, без использования УЗ.

*Липосомы с добавлением плуроника F68.* Как правило, для приготовления наносистем с плуроником используют концентрации 0.5–1%. В таком случае снижается риск аллергических реакций. Были приготовлены липосомы с различной концентрацией эфАСТ – от 0.1 до 0.5 мг/мл в 0.5- или 1%-ном водном растворе плуроника (табл. 2). Было выявлено, что липосомы, приго-

товленные с добавлением 0.5% плуроника, имели значительно более низкий PdI, чем с 1% (0.27 против 0.52 для 0.2 мг/мл эфАСТ и 0.36 против 0.47 для 0.3 мг/мл эфАСТ) (табл. 2).

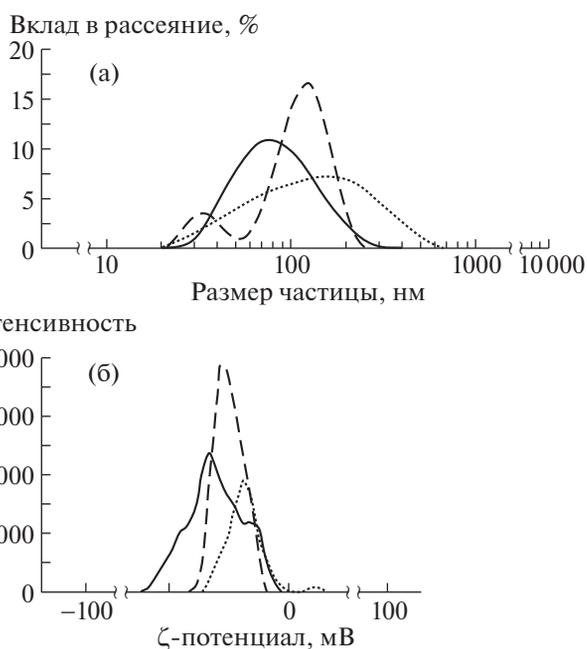
Для оптимизации состава липосом были приготовлены системы с различным содержанием плуроника (от 0.1 до 4%, табл. 3) и высокой концентрацией эфАСТ – 0.5 мг/мл, при которой контрольные липосомы без модификаторов выпадали в осадок в течение недели, а их средний размер составлял  $500 \pm 200$  нм.

В результате при добавлении плуроника в небольших концентрациях (0.1%) образуется прозрачный раствор, стабильный как минимум в течение недели. В диапазоне 0.3–2% плуроника липосомы имеют высокий PdI (от 0.391 до 0.529) и более низкую стабильность, о чем свидетельствует формирование масляного остатка эфАСТ на границе раздела фаз воздух–вода, а также снижение максимума поглощения раствора на 480 нм, характерного для АСТ и его эфиров.

Среди рассмотренных систем только с использованием 0.5%-ного раствора плуроника получались стабильные липосомы, а эфАСТ не отслаивались даже спустя 2 нед хранения при 5°C в холодильнике. В растворах с содержанием 2 и 4% плуроника образовывались крупные липосомы ( $500 \pm 200$  и  $275 \pm 20$  нм соответственно), из-за чего эфАСТ в течение недели частично отслаивались на поверхности.

Как видно из табл. 3, в растворах с содержанием плуроника 0.1 и 4% концентрация эфАСТ снижается на 15–20% в течение недели, что свидетельствует о низкой стабильности таких систем. Концентрация эфАСТ в растворе в образце 3 с 0.5% плуроника для сравнения снизилась всего на 2%. По-видимому, в слабоустойчивых растворах каротиноид выходит из состава липосом и сорбируется на поверхности пробирки.

Так как средний диаметр рассчитывали по интенсивности, вклад крупных липосом выше, чем



**Рис. 1.** Гистограмма распределения частиц по размерам (а) и  $\zeta$ -потенциалу (б) пустых липосом, полученные с использованием Malvern Zetasizer Nano, спустя 1 мес хранения при 5°C в холодильнике:  $\cdots$  – S75,  $---$  – S75 + F68 0.5%,  $—$  – S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4 М/М.

маленьких, поэтому считаем, что основной фракцией во всех системах являются фракции липосом ниже 100 нм, что согласуется с изображениями, полученными с использованием крио-ПЭМ (рис. 2).  $\zeta$ -потенциал липосом с плуроником находился в диапазоне  $-35 \pm 15$  мВ, где  $-15$  мВ показали наименее стабильные системы.

*Липосомы с добавлением DSPE-PEG 2000.* Для изучения оптимального соотношения ФХ : PEG-липид было приготовлено 10 составов образцов без/с эфАСТ, измерены размеры липосом,  $\zeta$ -потенциалы таких систем, а также стабильность при

**Таблица 2.** Размеры липосом с плуроником и их индекс полидисперсности (PdI) в разработанных системах с различной концентрацией эфАСТ

Образец	Состав системы	Средний диаметр, нм $\pm$ SD	PdI
1	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.1 мг/мл + плуроник 1%	$127 \pm 70$	0.42
2	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.2 мг/мл + плуроник 1%	$1000 \pm 200$	0.52
3	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.2 мг/мл + плуроник 0.5%	$31 \pm 10$	0.27
4	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.3 мг/мл + плуроник 1%	$140 \pm 40$ $52 \pm 20$ $265 \pm 100$	0.47
5	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.3 мг/мл + плуроник 0.5%	$80 \pm 10$ $310 \pm 85$	0.36

**Таблица 3.** Размеры липосом с плюронином и их индекс полидисперсности (PdI) в разработанных системах с разной концентрацией плюроника

Образец	Состав системы	Средний диаметр, нм ± SD	PdI	Снижение концентрации, %*
1	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 0.1%	141 ± 20	0.282	20
2	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 0.3%	122 ± 20 (43.9%) 615 ± 200 (51.3%)	0.505	6
3	<b>S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 0.5%</b>	<b>110 ± 15 (37%)</b> <b>440 ± 15 (63%)</b>	<b>0.427</b>	<b>2</b>
4	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 1%	75 ± 15 (36.6%) 450 ± 150 (61.3%)	0.529	5
5	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 2%	500 ± 200	0.391	3
6	S75 2 мг/мл + эфАСТ 0.5 мг/мл + плюроник 4%	275 ± 20	0.468	15

\* Снижение концентрации определялось по ОП раствора на длине волны 480 нм, и представляет собой долю (в %), на которую снизилась ОП раствора после хранения в течение 7 сут при 5°C в темноте.

хранении в течение недели при 5°C в холодильнике (табл. 4).

Было выявлено, что добавление DSPE-PEG 2000 снижает PdI образованных липосом, причем наиболее низкие значения PdI наблюдаются в системах S75 : DSPE-PEG 2000 в диапазоне от 10 : 4 до 10 : 10 соответственно. При увеличении доли пегелированного липида размеры липосом увеличиваются на 100–200 нм (до 300–400 нм), а PdI достигает 0.51 с эфАСТ. Во всех липосомах с DSPE-PEG 2000 при хранении в течение недели эфАСТ на поверхности воды практически не отслаивается, однако в образцах 2 (10 : 1, табл. 4) и 3 (10 : 2, табл. 4) выпал оранжевый осадок, предположительно липид со встроенными эфАСТ. Важно отметить, что в липосомах с низким содержа-

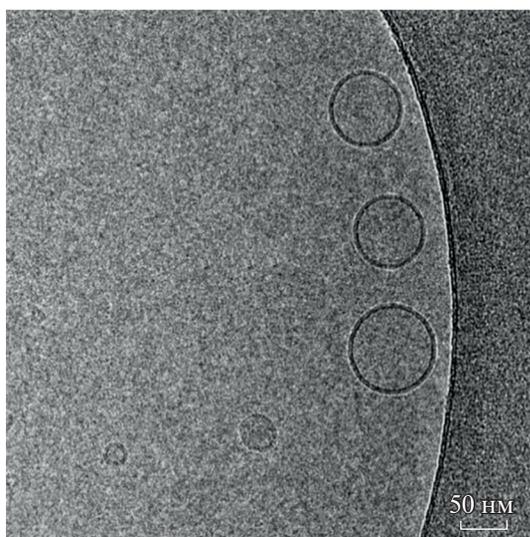
нием DSPE-PEG 2000 (образцы 10 : 1–10 : 3, табл. 4) и высоким (10 : 10–0 : 10 (табл. 4) значительно снижается ОП спустя одну неделю хранения (например, с 1.60 до 1.48 на 480 нм), в то время как в системах 10 : 4, 10 : 5 и 10 : 7 концентрация не меняется.

эфАСТ отлично встраиваются в липосомы с пегелированным липидом, благодаря чему впервые удалось получить стабильную систему с концентрацией эфАСТ более 0.5 мг/мл. Например, концентрация эфАСТ достигала 1 мг/мл в липосомах состава S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4 (2.5 мг/мл DSPE-PEG 2000). Система оказалась устойчивой в течение недели, концентрация эфАСТ снизилась всего на 3%. В растворе присутствовали три фракции липосом с PdI = 0.59: основные – 530 ± 80 и 105 ± 15 нм, а также незначительное количество с размером более 5 мкм. Фракцию размером более 5 мкм считали несущественной из-за завышенного вклада крупных липосом.

ζ-потенциалы липосом с DSPE-PEG 2000 варьировались в диапазоне –20...–70 мВ. Наиболее стабильные липосомы имели ζ-потенциал в диапазоне –60 ± 10 мВ.

Показано, что при использовании DSPE-PEG 2000 в липосомах с концентрацией эфАСТ 0.5 мг/мл, которая считается очень высокой для данного каротиноида (предельная растворимость для истинного раствора 1 мг/мл в диметилсульфоксиде (ДМСО)), образуются монодисперсные липосомы по сравнению с липосомами с добавлением плюроника (рис. 3). Это утверждение справедливо для составов S75 : DSPE-PEG 2000: от 10 : 3 до 10 : 10 М/М (табл. 4).

Липосомы, содержащие DSPE-PEG 2000, при добавлении 0.5 мг/мл эфАСТ значительно более прозрачны, чем контрольные, не содержащие пе-



**Рис. 2.** Изображения липосом S75 : плюроник 0.5% + 0.5 мг/мл эфАСТ, полученные методом крио-ПЭМ.

**Таблица 4.** Размеры липосом S75 : DSPE-PEG 2000 + эфАСТ 0.5 мг/мл и их PdI в разработанных системах с различным соотношением S75 : DSPE-PEG 2000 сразу после приготовления и спустя 1 нед хранения при 5°C в темноте

Образец	Соотношение S75 : DSPE-PEG 2000 (М/М)	После приготовления		1 нед после приготовления	
		$d_{cp}$ нм $\pm$ SD	PdI	$d_{cp}$ нм $\pm$ SD	PdI
1	10 : 0	340 $\pm$ 50	0.49	122 $\pm$ 20* $p = 0.013$ 615 $\pm$ 100	0.61* $p = 0.04$
2	10 : 1	110 $\pm$ 10 430 $\pm$ 100	0.45	95 $\pm$ 15 400 $\pm$ 50	0.48
3	10 : 2	140 $\pm$ 20 660 $\pm$ 50	0.58	65 $\pm$ 25* $p = 0.015$ 300 $\pm$ 50* $p = 0.0009$	0.4* $p = 0.022$
4	10 : 3	205 $\pm$ 15	0.4	230 $\pm$ 30	0.34
5	10 : 4	300 $\pm$ 40	0.35	255 $\pm$ 40	0.34
6	10 : 5	220 $\pm$ 40	0.39	200 $\pm$ 20	0.28* $p = 0.002$
7	10 : 7	220 $\pm$ 30	0.23	200 $\pm$ 20	0.24
8	10 : 10	190 $\pm$ 30	0.32	170 $\pm$ 20	0.26
9	5 : 10	160 $\pm$ 30 600 $\pm$ 200	0.42	282 $\pm$ 2* $p = 0.002$	0.188* $p = 0.0002$
10	1 : 10	230 $\pm$ 50	0.30	255 $\pm$ 35	0.28
11	0 : 10	530 $\pm$ 200	0.51	400 $\pm$ 50	0.40

\* Достоверные отличия параметров липосом после приготовления и спустя неделю при  $p < 0.05$ .

гилированных липидов, и липосомы с добавлением плуроника.

Липосомы, нагруженные пегилированными липидами, широко используются для увеличения растворимости гидрофобных биологически активных соединений (стелс-липосомы). В то же время существует единственная публикация о приготовлении таких липосом с АСТ [49], причем в работе используется одна концентрация: ФХ : ПЕГ-липид – 95 : 5 (моль. %).

Так же как у липосом с добавлением плуроника, при изучении липосом S75 : DSPE-PEG 2000 методом крио-ПЭМ было выявлено, что основная фракция имеет диаметр ниже 100 нм (рис. 4).

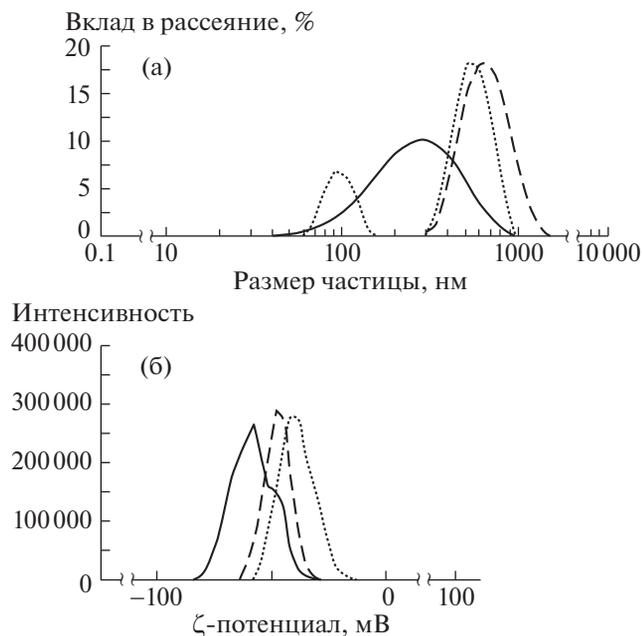
*Выживаемость мононуклеарных клеток крови.* Жизнеспособность МНК оценивали через 24 ч после инкубирования с модифицированными липосомами методом окрашивания трипановым синим. При  $82 \pm 2\%$  выживаемости контрольных образцов без липосом процент выживших клеток, инкубированных с липосомами разного состава, –  $84 \pm 4\%$ . При этом не было статистических различий липосом в зависимости от модификатора или наличия эфАСТ. Исследуемые липосомы не оказывают цитотоксического действия.

*Антиоксидантную активность полученных липосом* изучали при инактивации катион-радикала АВТС. Катион-радикал образуется при инкубации АВТС с персульфатом калия  $K_2S_2O_8$  в течение суток и сопровождается изменением окраски раствора с бледно-желтой до темно-изумрудной. При этом катион-радикал имеет несколько максимумов поглощения, самые интенсивные при 405 и 734 нм. Поскольку спектр поглощения АСТ и его эфиров перекрывается с полосой 405 нм для катион-радикала АВТС, тушение определяли на длине волны 734 нм.

Анализ проводили для пустых и нагруженных эфАСТ (0.2 мг/мл) липосом трех составов:

- S75 2 мг/мл;
- S75 2 мг/мл + плуроник 0.5%;
- S75 2 мг/мл + DSPE-PEG 2000 10 : 4 М/М.

Измерение ОП проводили в течение 90 мин инкубации липосом с катион-радикалом АВТС. В течение этого времени максимум поглощения на 734 нм постоянно снижался. На рис. 5 представлены значения после 90 мин инкубации, когда наблюдается достоверное снижение ОП липосом, нагруженных эфАСТ, по сравнению с липо-

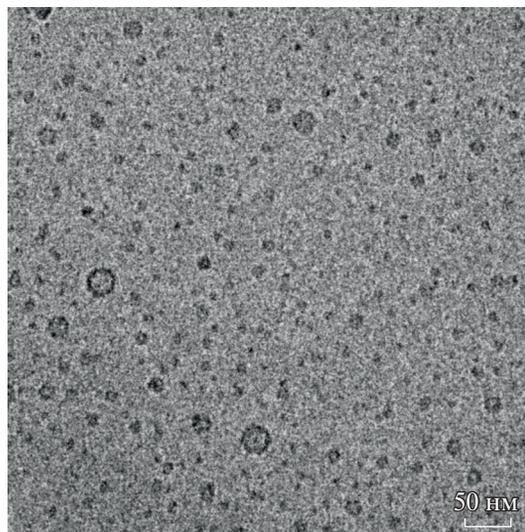


**Рис. 3.** Гистограмма распределения частиц по размеру (а) и по  $\zeta$ -потенциалу (б) липосом с 0.5 мг/мл эфАСТ, спустя 1 мес хранения при 5°C в холодильнике. Данные получены с использованием программного обеспечения установки Malvern Zetasizer Nano; ..... — S75, ---- — S75 + F68 0.5%, — — S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4 М/М.

сомами, не содержащими эфАСТ. В качестве контроля использовали раствор катион-радикала АВТС без добавления липосом.

Как видно из рис. 5, все липосомы, как пустые, так и нагруженные эфАСТ, удаляют радикал, что может быть связано с наличием в препарате липидов продуктов окисления. Например, молекула липида ЛН или гидроперекиси LOOH взаимодействует с радикалом, превращая его в молекулу АВТС, что и проявляется в снижении поглощения на 734 нм. Кроме того, сам плуроник снижает ОП, однако его вклад очень низкий — около 6% от контрольного значения. Это объясняет лучший эффект пустых липосом с плуроником.

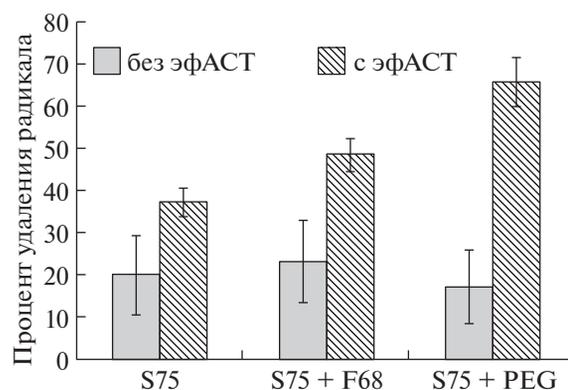
Важно отметить, что процент удаления радикала АВТС в липосомах, содержащих 0.2 мг/мл эфАСТ, выше, чем без эфАСТ. Это является прямым доказательством антиоксидантных свойств эфАСТ, включенных в липосомальную форму. Так, в нагруженных эфАСТ липосомах без модификаторов антиоксидантный эффект составляет ~17%, с плуроником F68 — 25%, а с DSPE-PEG 2000 — более 45%. По-видимому, такой эффект связан с лучшим распределением эфАСТ в липосомах с модификаторами, особенно с DSPE-PEG 2000, что подтверждается более высокой концентрацией каротиноида в пегелированных липосомах, определяемой по ОП растворов.



**Рис. 4.** Изображения липосом S75 : DSPE-PEG 2000 10 : 4 м/м + 0.5 мг/мл эфАСТ, полученные методом крио-ПЭМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была приготовлена стабильная липосомальная форма эфиров астаксантина, позволявшая повысить его растворимость в воде и биодоступность. В качестве модификаторов для улучшения стабильности разработанных систем использовали плуроник F68 или DSPE-PEG 2000. Липосомы хорошо диспергировались и имели сферическую форму, что было выявлено методом крио-ПЭМ. Подобраны оптимальные составы: S75 + плуроник 0.5% и S75 : DSPE-PEG



**Рис. 5.** Удаление АВТС-радикала липосомами без эфАСТ или содержащими 0.2 мг/мл эфАСТ после 90 мин инкубации в темноте при комнатной температуре. Составы липосом: S75 2 мг/мл, S75 2 мг/мл + F68 0.5%, S75 2 мг/мл + DSPE-PEG 2000 10 : 4 М/М. \* — значимость разницы удаления АВТС-радикала липосом с эфАСТ против липосом без эфАСТ того же состава; \* —  $p < 0.05$ . Представлены средние значения  $\pm$  SEM.

2000 10 : 4 М/М для липосом с плуроником и пегилированным липидом соответственно. Сравнение показателей размера, индекса полидисперсности и концентрации эФАСТ до и после хранения липосом в течение 1 нед позволяет сделать вывод, что липосомы сохраняют свою форму и стабильны как минимум в течение 1 нед хранения. Применение УЗ-дезинтегратора приводит к уменьшению размера липосом до 100 нм, но при этом разрушает АСТ. Поэтому липосомы с эФАСТ были получены без дезинтегрирования УЗ.

Анализ тушения радикала АВТС показал, что липосомы с эФАСТ проявляют высокую антиоксидантную активность, а проверка выживаемости МНК показала  $84 \pm 4\%$  выживаемости клеток при инкубации их с липосомами в течение 24 ч. Данное исследование показывает, что липосомы с эФАСТ могут стать ценной системой для их использования в адресной доставке, однако для защиты эФАСТ от окислительной деструкции под действием света и улучшения стабильности имеет смысл добавлять в липосомы антиоксиданты.

Работа выполнена в рамках тематического плана НИЦ “Курчатовский институт” 1ф.4.1: “Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах, направленное на поиск новых подходов к созданию терапевтических средств, новых биоэнергетических устройств и систем искусственного фотосинтеза” и договора № 07-1-21 МГУ им. М.В. Ломоносова “Физико-химические свойства биомембран в норме, при патологии и воздействии факторов окружающей среды”.

В работе использовалось оборудование ресурсного центра “Зондовой и электронной микроскопии” НИЦ “Курчатовского института”.

Авторы выражают благодарность представительству Lipoid AG и его главе А.В. Сымону за предоставленные липиды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bustamante A., Roberts P., Aravena R., Valle J.* // 11th Int. Congr. Eng. Food. 2011. P. 5. <https://doi.org/10.3390/md16110432>
2. *Takaichi S., Matsui K., Nakamura M. et al.* // Comp. Biochem. Physiol. B. 2003. V. 136. № 2. P. 317. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(03\)00209-4](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(03)00209-4)
3. *Taksima T., Chonpathompikunlert P., Sroyraya M. et al.* // Mar. Drugs. 2019. V. 17. № 11. <https://doi.org/10.3390/md17110628>
4. *Boussiba S., Fan L., Vonshak A.* // Methods Enzymol. 1992. V. 213. № C. P. 386. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)13140-S](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)13140-S)
5. *Wu T.H., Liao J.H., Hou W.C. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 6. P. 2418. <https://doi.org/10.1021/jf052651q>
6. *Du H.H., Liang R., Han R.M. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2015. V. 63. № 41. P. 9124. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03658>
7. *Kobayashi M., Sakamoto Y.* // Biotechnol. Lett. 1999. V. 21. № 4. P. 265. <https://doi.org/10.1023/A:1005445927433>
8. *Miao F., Lu D., Li Y., Zeng M.* // Anal. Biochem. 2006. V. 352. № 2. P. 176. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.006>
9. *Rodrigues E., Mariutti L.R.B., Mercadante A.Z.* // Mar. Drugs. 2012. V. 10. № 8. P. 1784. <https://doi.org/10.3390/md10081784>
10. *Gammone M.A., Riccioni G., D’Orazio N.* // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № 10. P. 6226. <https://doi.org/10.3390/md13106226>
11. *Naguib Y.M.A.* // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. № 4. P. 1150. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
12. *Viazau Y.V., Goncharik R.G., Kulikova I.S. et al.* // Bioresour. Bioprocess. 2021. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00410-5>
13. *Böhm F., Edge R., Truscott G.* // Mol. Nutr. Food Res. 2012. V. 56. № 2. P. 205. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100222>
14. *Ambati R.R., Moi P.S., Ravi S., Aswathanarayana R.G.* // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № 1. P. 128. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
15. *Che H., Li Q., Zhang T. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 66. № 19. P. 4948. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00988>
16. *Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A.* // Russ. J. Biopharm. 2013. V. 5. № 5. P. 13. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-179-192>
17. *Galasso C., Corinaldesi C., Sansone C.* // Antioxidants. 2017. V. 6. № 4. <https://doi.org/10.3390/antiox6040096>
18. *Kohandel Z., Farkhondeh T., Aschner M., Samarghandian S.* // Biomed. Pharmacother. 2021. V. 137. P. 111374. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111374>
19. *Iwamoto T., Hosoda K., Hirano R. et al.* // J. Atheroscler. Thromb. 2000. V. 7. № 4. P. 216. <https://doi.org/10.5551/jat1994.7.216>
20. *Kishimoto Y., Yoshida H., Kondo K.* // Mar. Drugs. 2016. V. 14. № 2. P. 1. <https://doi.org/10.3390/md14020035>
21. *Fakhri S., Dargahi L., Abbaszadeh F., Jorjani M.* // Eur. J. Pain (United Kingdom). 2019. V. 23. № 4. P. 750. <https://doi.org/10.1002/ptr.6797>
22. *Landon R., Gueguen V., Petite H. et al.* // Mar. Drugs. 2020. V. 18. № 7. P. 1. <https://doi.org/10.3390/md18070357>
23. *Yang Y., Hu S., He J. et al.* // Medicine (Baltimore). 2019. V. 98. № 42. P. e17557. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017557>
24. *Park J.S., Chyun J.H., Kim Y.K. et al.* // Nutr. Metab. 2010. V. 7. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-18>
25. *Wang Y., Mandelkow E.* // Nat. Rev. Neurosci. 2016. V. 17. № 1. P. 5. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>

26. *Grimmig B., Hudson C., Moss L. et al.* // *GeroScience*. 2019. V. 41. № 1. P. 77.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-019-00051-9>
27. *Lobos P., Bruna B., Cordova A. et al.* // *Neural Plast.* 2016. V. 2016.  
<https://doi.org/10.1155/2016/3456783>
28. *Rahman S.O., Panda B.P., Parvez S. et al.* // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 110. P. 47.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.043>
29. *Galasso C., Orefice I., Pellone P. et al.* // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16. № 8. P. 1.  
<https://doi.org/10.3390/md16080247>
30. *Yuan J.P., Peng J., Yin K., Wang J.H.* // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. V. 55. № 1. P. 150.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201000414>
31. *Hama S., Uenishi S., Yamada A. et al.* // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. V. 35. № 12. P. 2238.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00715>
32. *Barros M.P., Pinto E., Colepicolo P., Pedersén M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 288. № 1. P. 225.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5765>
33. *Kamezaki C., Nakashima A., Yamada A. et al.* // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2016. V. 59. № 2. P. 100.  
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.15-153>
34. *Tan C., Xue J., Abbas S. et al.* // *J. Agric. Food Chem.* 2014. V. 62. № 28. P. 6726.  
<https://doi.org/10.1021/jf405622f>
35. *Cantrell A., McGarvey D.J., Truscott T.G. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 412. № 1. P. 47.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00014-6)
36. *Goto S., Kogure K., Abe K. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2001. V. 1512. № 2. P. 251.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00326-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00326-1)
37. *Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., Nasirpour A.* // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2014. V. 26. P. 366.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.012>
38. *Meor Mohd Affandi M.M.R., Julianto T., Majeed A.B.A.* // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2011. V. 4. Suppl. 1. P. 143.
39. *Kim D.M., Hyun S.S., Yun P. et al.* // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2012. V. 34. № 1. P. 64.  
<https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00682.x>
40. *Palchetti S., Colapicchioni V., Digiacomo L. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2016. V. 1858. № 2. P. 189.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.012>
41. *James N.D., Coker R.J., Tomlinson D. et al.* // *Clin. Oncol.* 1994. V. 6. № 5. P. 294.  
[https://doi.org/10.1016/s0936-6555\(05\)80269-9](https://doi.org/10.1016/s0936-6555(05)80269-9)
42. *Yang T., Choi M.K., Cui F. De et al.* // *J. Control. Release.* 2007. V. 120. № 3. P. 169.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.011>
43. *Santander-Ortega M.J., Jódar-Reyes A.B., Csaba N. et al.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. V. 302. № 2. P. 522.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.031>
44. *Ma G., Song C.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 2007. V. 104. № 3. P. 1895.  
<https://doi.org/10.1002/app.25866>
45. *Orlef A., Stanek E., Czamara K. et al.* // *Chem. Commun. Royal Soc. Chem.* 2022. V. 58. № 64. P. 9022.  
<https://doi.org/10.1039/d2cc02649j>
46. *Dai M., Li C., Yang Z. et al.* // *Antioxidants.* 2020. V. 9. № 2. P. 1.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9020126>
47. *Chintong S., Phatvej W., Rerk-Am U. et al.* // *Antioxidants.* 2019. V. 8. № 5. P. 1.  
<https://doi.org/10.3390/antiox8050128>
48. *Weesepeel Y., Gruppen H., De Bruijn W., Vincken J.P.* // *J. Agric. Food Chem.* 2014. V. 62. № 42. P. 10254.  
<https://doi.org/10.1021/jf503520q>
49. *Chen Z., Li W., Shi L. et al.* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2020. V. 156. P. 143.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.09.005>