

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИМЕРНОЙ
КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ СИЛИБИН© 2024 г. С. Л. Кузнецов¹, Н. В. Гукасова¹, И. А. Тубашева¹, В. В. Заварзина¹, С. В. Алешин¹,
А. И. Муравьева¹, А. А. Лапин², В. Н. Зеленков³, Ю. И. Полтавец^{1,*}¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия²Казанский государственный энергетический университет, Казань, Республика Татарстан, Россия³Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

*E-mail: poltavets_yi@nrcki.ru

Поступила в редакцию 18.07.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

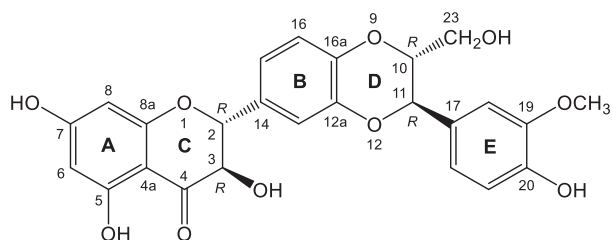
Препараты на основе силибина используются в качестве гепатопротекторов при лечении поражений печени различной этиологии. Основным недостатком, ограничивающим их применение, является невысокая биодоступность, связанная с низкой растворимостью силибина в воде. Для решения этой проблемы создавались многочисленные системы доставки, увеличивающие его растворимость, в том числе на основе биodeградируемых полимеров. Представлен способ получения полимерной композиции, содержащей силибин (ПКС), на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот. Содержание действующего вещества в продукте – 5%, эффективность его включения в частицы – более 90%, средний размер частиц в водной суспензии ~200 нм, индекс полидисперсности – менее 0,2, ζ-потенциал – от –1 до –5 мВ. Показана высокая антиоксидантная активность силибина в составе полимерной композиции методом гальваностатической кулонометрии, а также в реакции неферментативного автоокисления адреналина. В исследовании *in vivo* на модели острого токсического гепатита, индуцированного тетрахлорметаном, установлено более выраженное гепатопротекторное действие ПКС по сравнению со свободным силибином.

DOI: 10.56304/S1992722323601349

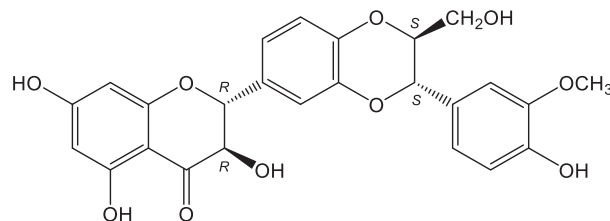
ВВЕДЕНИЕ

Препараты расторопши пятнистой (*Silibum marianum* (L.) Gaertner), получаемые на основе силимарина (многокомпонентного стандартизированного сухого экстракта из плодов этого растения) и его главного компонента – флавонолигнана силибина (рис. 1), используются в основном как гепатопротекторы при лечении поражений печени различной этиологии (вирусной, токсической, алкогольной, метаболической) [1–5].

Гепатопротекторная активность силибина реализуется главным образом вследствие его антиоксидантного, мембраностабилизирующего и противовоспалительного действия [6–9]. Силибин проявляет антиоксидантное действие как за счет собственной антирадикальной активности, инактивируя радикалы в окислительно-восстановительных реакциях, так и путем регуляции активности ферментативных анти- и прооксидантных систем в клетке. Антирадикальная активность силибина обусловлена его полифенольной



Silybin A (2R, 3R, 10R, 11R)



Silybin B (2R, 3R, 10S, 11S)

Рис. 1. Структурные формулы природных изомеров силибина.

структурой — он реагирует со свободными радикалами, в том числе с активными формами кислорода (супероксид анион-радикал, пероксид водорода, гидроксил радикал и др.), липидными радикалами, ингибируя процессы перекисного окисления липидов, повреждения биомолекул и разрушения клеточных мембран [6, 7]. Кроме того, силибин обладает мембраностабилизирующей активностью — взаимодействует с жирными кислотами фосфолипидов мембран, снижает подвижность фосфолипидов, повышает их устойчивость к радикалообразованию [9].

Основной проблемой, ограничивающей применение препаратов расторопши пятнистой, является низкая растворимость силимарина [10] и силибина [11] в воде и, как следствие, невысокая биодоступность. В связи с этим предпринимаются попытки различными способами их повысить. В [12–15] описаны нано- и микроструктурированные системы доставки силимарина и силибина, в том числе в виде липосом, нано- и микроэмульсий, нанокристаллов, твердых дисперсий, полимерных частиц, комплексов включения и др. Заметная доля этих исследований посвящена изучению полимерных частиц, нагруженных силибином и силимарином [16–19], в том числе на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), которые используются при получении ряда эффективных фармацевтических препаратов [20, 21]. К достоинствам полимерных частиц можно отнести получение однородных по размеру субмикронных фракций, в составе которых активная субстанция находится в аморфном состоянии и не образует кристаллов. Таким способом достигается повышение биодоступности мало-растворимых веществ, поскольку суммарная площадь поверхности субмикронных частиц в единице объема велика, а процесс высвобождения активного компонента из них не требует предварительного разрушения кристаллической структуры.

При получении полимерных частиц, содержащих силибин (силимарин), применялись различные способы, в том числе эмульгирования, нанопреципитации, ионотропного гелеобразования, их комбинации и др. [16–19]. Перечисленные подходы имеют как достоинства, так и недостатки (ограничения), касающиеся главным образом размеров получаемых частиц, эффективности включения в них действующего вещества. В настоящей работе для получения полимерных композиций силибина (ПКС) применялся метод эмульгирования в системе “масло в воде” (О/В) с помощью ультразвука (УЗ) с последующим удалением органических растворителей в вакууме и лиофилизацией суспензии полимерных частиц.

Цель настоящей работы — получение полимерной композиции на основе PLGA, содержа-

щей силибин, оценка ее антиоксидантной активности и гепатопротекторного действия в сравнении со свободным силибином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При получении ПКС и проведении аналитических работ использовали следующие основные химические реактивы и материалы, технологическое и аналитическое оборудование.

Реактивы. Силибин, $\geq 98\%$ (S0417, Sigma, Бельгия); сополимер молочной и гликолевой кислот PURASORB® PDLG 5004 (PURAC biochemical, Нидерланды); поливиниловый спирт (ПВС) со степенью гидролиза 87–90%, mol wt 30.000–70.000 (P8136, Sigma-Aldrich, США); натрия хлорид, х. ч., ГОСТ 4233-77; этилацетат, х. ч., ГОСТ 22300-76, изм. 1, 2, 3 (ООО ТД “Химмед”, РФ); дихлорметан, х. ч., ТУ COMP 2-026-08; вода очищенная (ФС.2.2.0020.15).

Оборудование. Весы лабораторные электронные Vibra AF 225DRCE, 0.01 мг, max 92 г/220 г, min 0.001 г (Shinko Denshi Co. Ltd., Япония); магнитная мешалка RST Basic (IKA®, ФРГ); УЗ-гомогенизатор VCX-750, SONICS Vibra-Cell™ с наконечником УЗ-зонда — 1/8" (3 mm) tapered microtip (Part No 630-0418) (Sonics & Materials, США); испаритель ротационный Hei-VAP Precision ML/G38 (Heidolph, ФРГ); лиофильная сушилка Christ® Alpha 1-40 LD Plus (M. Christ, ФРГ).

Получение ПКС (общая методика). К 0.25%-ному раствору ПВС — водная фаза — при интенсивном перемешивании (700 об./мин) на магнитной мешалке и комнатной температуре добавляли по каплям органическую (неводную) фазу — раствор силибина и сополимера PDLG 5004 в смеси этилацетат–дихлорметан или в чистом этилацетате (табл. 1) в течение 2.5–8 мин. Соотношение органической и водной фаз составляло $\sim 1 : 7$ об./об. Проводили эмульгирование полученной смеси на льду с использованием УЗ-гомогенизатора при заданной энергии (мощности) 200 или 50 Дж. К образовавшейся эмульсии (типа О/В) добавляли водный раствор хлорида натрия (0.10 г в 2 мл). Проводили удаление органических растворителей на ротационном испарителе с мембранным вакуумным насосом при остаточном давлении от 150 до 30 мбар и постепенном увеличении температуры в бане до 40°C. Образовавшуюся суспензию фильтровали через стеклянный пористый фильтр (40–110 мкм). Фильтрат замораживали в жидком азоте, высушивали на лиофильной сушилке при остаточном давлении 0.04–0.05 мбар и комнатной температуре в помещении в течение суток. Продукт — ПКС в виде лиофилизата — выгружали в пластиковый контейнер с герметично закручиваемой крышкой и помещали на хранение при 4°C.

Таблица 1. Количество компонентов и растворителей, использованных при получении полимерных композиций, содержащих силибин

Опыт	Органическая фаза				ПВС в водной фазе*, г	Хлорид натрия, г	Энергия** ультразвука, Дж
	Силибин, г	PDLG 5004, г	Этилацетат, мл	Дихлорметан, мл			
SN-06	0.02569	0.25280	6.3		0.11	0.10021	200
SN-08	0.02534	0.25155	4.5	2	0.11	0.10020	200
SN-14	0.02529	0.25361	4.5	2	0.11	0.10500	200
SN-15	0.02526	0.25006	4.5	2	0.11	0.10541	50
SN-16	0.02517	0.25184	6.3		0.11	0.10281	50
SN-17	0.02560	0.25074	4.5	2	0.11	0.10193	50

*Раствор ПВС – 0.25 мас. %.
**Параметры УЗ-воздействия: энергия – 200 или 50 Дж, амплитуда – 65%, пульсирующий режим – 02/02 с, время – 1 мин, температура – 50°C.

Таблица 2. Результаты анализа полимерных композиций, содержащих силибин

Образец	Содержание силибина, мас. %	Средний размер частиц*, нм	PdI*	ζ-потенциал*, мВ	Эффективность включения силибина (ЕЕ), %
SN-06	5.14	193.5 ± 3.828	0.245 ± 0.023	–1.50 ± 0.205	96
SN-08	5.07	203.2 ± 2.458	0.167 ± 0.051	–3.15 ± 0.210	98
SN-14	3.99	194.7 ± 1.015	0.103 ± 0.020	–3.38 ± 0.0737	95
SN-15	2.65	202.9 ± 1.127	0.113 ± 0.029	–1.92 ± 0.127	94
SN-16	4.73	366.6 ± 28.03	0.532 ± 0.046	–2.58 ± 0.189	96
SN-17	5.15	202.2 ± 2.170	0.182 ± 0.018	–4.70 ± 0.295	97

*Среднее ± стандартное отклонение, n = 3.

Количественное определение силибина в образцах ПКС выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при УФ-детектировании (**ВЭЖХ-УФ**) с использованием системы Agilent 1200 с диодноматричным детектором G1315C (Agilent Technologies, США) на колонке Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μm 4.6 × 250 mm. Для приготовления подвижных фаз и пробоподготовки использовались: ацетонитрил для ВЭЖХ; кислота ортофосфорная концентрированная, х. ч.; калий фосфорнокислый однозамещенный, х. ч., ГОСТ 4198-75; диметилсульфоксид (**ДМСО**), х. ч. (ООО “Компонент-реактив”, РФ); вода аналитического качества тип I (Milli-Q).

Подвижная фаза: элюент А – ацетонитрил (40%), элюент Б – фосфатный буферный раствор, рН 3.0 (60%). Режим элюирования – изократический. Температура термостата колонок – 30°C. Скорость потока элюента – 1.1 мл/мин. Аналитическая длина волны – 288 ± 4 нм. Объем вводимой пробы – 35 мкл. Время удерживания пика силибина ~4.2 мин. Силибин (субстанция) и испытуемый образец в количестве 20 мг (точные навески) загружали в две мерные колбы объемом

100 мл, растворяли каждую в 1 мл ДМСО, довели до метки смесью ацетонитрил–вода (1 : 1), тщательно перемешивали. Отбирали по 1 мл раствора, центрифугировали при 14 тыс. об./мин (~13000 g) в течение 10 мин и проводили анализ. Хроматографировали растворитель, стандартный раствор (не менее 5 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз). Содержание силибина *X* в образце (мас. %) вычисляли по формуле

$$X = (S_1 a_0 P) / (S_0 a_1), \tag{1}$$

где *S*₁, *S*₀ – площадь пика силибина на хроматограмме испытуемого и стандартного раствора соответственно (средние значения); *a*₁, *a*₀ – навеска испытуемого и стандартного образцов силибина, г; *P* – содержание основного вещества в стандартном образце силибина, мас. %. Результаты представлены в табл. 2.

Оценка эффективности включения силибина в полимерные частицы (ЕЕ – entrapment efficiency) проводилась методом ВЭЖХ-УФ. Величину ЕЕ находили из отношения количества, включенного в состав частиц силибина, к общему его количеству в навеске испытуемого образца [18]. Испы-

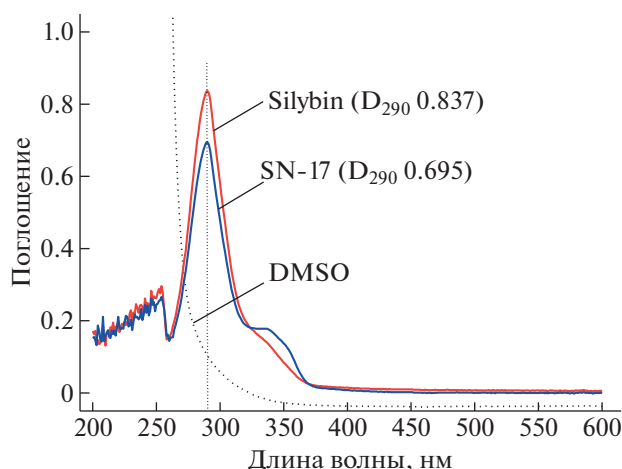


Рис. 2. Спектры поглощения растворов в ДМСО: силибина (0.015 мг/мл) и образца SN-17 (3 мг/мл), пунктиром показан спектр поглощения ДМСО относительно воды.

туемый образец в количестве 30 мг суспендировали в 5.0 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), pH 7.4, при перемешивании на магнитной мешалке (300 об./мин) в течение 10 мин. Суспензию центрифугировали при 18 тыс. об./мин и 4°C в течение 20 мин. Супернатант отбирали (пипеточным дозатором), добавляли к осадку 5.0 мл PBS и ресуспендировали на магнитной мешалке (300 об./мин) в течение 10 мин. Суспензию повторно центрифугировали в тех же условиях. Второй супернатант также отбирали, объединяли с первым и перемешивали. Хроматографически определяли содержание силибина (мг/мл) в объединенном супернатанте (условия описаны выше). Расчет величины *EE* (%) проводили по формуле

$$EE = ((W_{\text{Sib}} - W_{\text{Sib}}^{\text{sup}}) / W_{\text{Sib}}) \times 100, \quad (2)$$

где *EE* – эффективность включения силибина в частицы, %; W_{Sib} , $W_{\text{Sib}}^{\text{sup}}$ – количество силибина в навеске образца и объединенном супернатанте, мг. Результаты приведены в табл. 2.

Спектры поглощения растворов. При получении спектров поглощения в качестве растворителя использовали ДМСО, х. ч. (ООО “Компонент-реактив”, РФ), в котором растворимы все компоненты ПКС. Для приготовления раствора стандартного образца силибина (0.015 мг/мл) 1.5 мг субстанции растворяли в 10 мл ДМСО, отбирали 1 мл в мерную колбу объемом 10 мл, доводили объем до метки ДМСО и перемешивали. Раствор испытуемого образца (3 мг/мл) готовили путем растворения 30 мг ПКС в 10 мл ДМСО. Для проведения измерений использовали стеклянные (кварцевые) кюветы объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см и фторопластовыми крышками.

Спектры поглощения получали относительно чистого ДМСО в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм. Кривые поглощения (рис. 2) строили по экспериментальным данным с использованием программы OriginPro 2017 v. 9.4 (OriginLab Corporation, США).

Анализ частиц водной суспензии ПКС проводили методами динамического и электрофоретического рассеяния света с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Получали распределение частиц по размерам, средний (*Z-average*) размер частиц (средний гидродинамический диаметр, нм), индекс полидисперсности (**PdI**) и ζ -потенциал (мВ) частиц. Суспензию испытуемого образца готовили путем встряхивания навески в деионизированной воде (0.2–0.4 мг/мл) в течение 1 мин, УЗ-обработку не проводили. Для выполнения измерений 1.5 мл приготовленной суспензии загружали в стеклянную спектрофотометрическую кювету объемом 4 мл с фторопластовой крышкой, длина оптического пути 1 см. Для определения ζ -потенциала применяли специальную U-образную пластиковую кювету объемом 1 мл. Анализ проводили по стандартизованному протоколу измерений при температуре образца 25°C в трех повторях, табл. 2.

Изображение полимерных частиц, нагруженных силибином, получали с помощью просвечивающей криоэлектронной микроскопии (**крио-ПЭМ**) на просвечивающем растровом электронном микроскопе FEI Titan Krios™ 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США). Суспензию испытуемого образца (1–2 мг/мл) в количестве 3 мкл помещали на предварительно гидрофилизированную опорную решетку. После остекловывания в жидком этане рабочий образец переносили (в жидком азоте) на станцию прессования и помещали в кассетный держатель в криогенных условиях. Изображения получали при ускоряющем напряжении 300 кВ на просвечивающем криоэлектронном микроскопе, оснащенном корректором сферических аберраций (CEOS, ФРГ), в режиме низкой дозы с использованием программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США), рис. 4.

Суммарную антиоксидантную активность (CAOA) образцов определяли методом гальваностатической кулонометрии с использованием электрогенерированного брома на кулонометре Эксперт-006 (НПК ООО “Эконикс-Эксперт”, РФ) по методике МВИ-01-00669068-13 [22, 23]. Навески силибина 0.058 г и 0.100 г образца SN-17 растворяли при встряхивании в 20 см³ буферного раствора (pH 10.7). Электрогенерацию брома осуществляли из 0.2 М раствора бромата калия в 0.1 М водном растворе серной кислоты при постоянной силе тока 100.0 мА. В электролитическую ячейку загружали 30 мл фонового раствора и

Таблица 3. Суммарная антиоксидантная активность, определенная методом гальваностатической кулонометрии

Образец	САОА, г рутина на 100 г с. о.	<i>E</i> отн. %*
Силибин (субстанция)	5.517 ± 0.069	1.25
Полимерная композиция SN-17	3.662 ± 0.084	2.3

*Относительная ошибка определения показателя САОА.

при достижении индикаторным током определенного значения вносили 0.05 см³ (50 мкл) раствора (или суспензии) образца. Измерения проводили при комнатной температуре. Прибор калибровали спиртовым раствором рабочего стандартного образца (РСО) рутина [24], приготовленного по Государственной фармакопее СССР 11 изд. [25]. Показатель САОА выражали в миллиграммах РСО рутина на 1 дм³ (л) извлечения или граммах рутина на 100 г исследуемого сухого образца (с. о.). Определяли модальное значение величины САОА для 10 измерений [26] и относительную ошибку определения (*E* отн. %), табл. 3.

Антиоксидантную активность (АОА) образцов определяли *in vitro* в модельном эксперименте по регистрации образования адренохрома при 347 нм при ингибировании реакции неферментативного автоокисления адреналина [27]. Для проведения анализа к 1 мл 0.2 М бикарбонатного буферного раствора (рН 10.65) при комнатной температуре добавляли 0.1 мл раствора адреналина гидрохлорида (0.1 мас. %) (ФГУП “Московский эндокринный завод”, РФ), тщательно перемешивали (раствор А) и определяли оптическую плотность раствора в течение 10 мин при длине волны 347 нм (*D*1) на спектрофотометре. Далее в 1 мл бикарбонатного буферного раствора (рН 10.65) вносили 0.1 мл исследуемых образцов полимерных частиц, нагруженных силибином, или субстанции силибина (до конечной концентрации по силибину 0.1 мкМ). Добавляли 0.1 мл раствора адреналина гидрохлорида (0.1 мас. %) (раствор Б) и определяли оптическую плотность реакционной смеси, как описано выше (*D*2). Показатель АОА испытуемых образцов выражали в процен-

тах ингибирования автоокисления адреналина и рассчитывали по формуле

$$АОА = ((D1 - D2)/D1) \times 100, \tag{3}$$

где АОА – показатель антиоксидантной активности, %; *D*1, *D*2 – оптическая плотность раствора А и Б соответственно.

Каждый образец анализировали пятикратно, результаты представлены в табл. 4.

Исследование гепатопротекторного действия выполняли *in vivo* в соответствии с правилами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных целях [28], и протоколом биоэтической комиссии НИЦ “Курчатовский институт”. Эксперимент проводили на модели токсического гепатита, индуцированного однократным внутривенным введением раствора тетрахлорметана (ССl₄) в оливковом масле в дозе 1 мл/кг мышам-самцам линии С57BL/6 25 ± 2 г. Животные были разделены на четыре группы (по пять особей в каждой): контроль, группа с введением ССl₄ и две опытные группы с введением сравниваемых препаратов и ССl₄. Полимерные частицы с силибином вводили животным в соответствии с профилактической схемой ежедневно в течение 4 сут до введения ССl₄ в дозе 100 мг/кг внутривенно в виде суспензии в воде, при этом последнее введение осуществляли за 1 ч до применения ССl₄. Препарат сравнения (силибин) вводили аналогично в 1%-ном водном растворе крахмального клейстера. Животных подвергали эвтаназии через 24 ч после введения ССl₄ и проводили забор крови для проведения биохимических исследований. Активность ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) определяли методом Райтмана–Френкеля (диагностический набор “Ольвекс Диагностикум”, РФ); активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли “по конечной точке” с *n*-нитрофенилфосфатом (диагностический набор “Витал Девелопмент Корпорейшн”, РФ), табл. 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика образцов ПКС. Лиофилизаты полимерных частиц, содержащих

Таблица 4. Антиоксидантная активность, определенная методом ингибирования автоокисления адреналина

Образец	АОА, %*				
	1 мин	3 мин	5 мин	7 мин	10 мин
Силибин (субстанция)	20.4 ± 2.9	16.3 ± 1.8	10.5 ± 1.3	9.3 ± 0.8	8.0 ± 0.6
Полимерная композиция SN-17	61.8 ± 8.2	33.3 ± 3.9	20.5 ± 2.4	14.5 ± 1.3	8.8 ± 0.7

*Среднее ± стандартное отклонение, *n* = 5.

Таблица 5. Показатели активности ферментов АЛТ, АСТ и ЩФ в крови мышей после введения препаратов в условиях модельного CCl_4 -индуцированного гепатита ($M \pm m$)¹

Группа животных	АЛТ, Ед./л	АСТ, Ед./л	ЩФ, Ед./л
Контроль	21.1 ± 2.8	32.4 ± 1.5	161.4 ± 7.8
CCl_4	$141.1 \pm 4.5^\#$	$49.2 \pm 2.1^\#$	$647.3 \pm 6.5^\#$
Полимерная композиция SN-17 + CCl_4	$106.2 \pm 3.9^{*\#}$	43.9 ± 1.8	$369.1 \pm 5.9^{*\#}$
Силибин (субстанция) + CCl_4	$150.0 \pm 5.7^\#$	$51.0 \pm 2.3^\#$	$569.2 \pm 6.3^{*\#}$

Примечание. Достоверность различий показателей по сравнению: [#] – с животными контрольной группы ($p < 0.05$); * – с животными группы, которой вводили только CCl_4 ($p < 0.05$).

¹Среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n = 5$.

силибин, получали методом простых эмульсий с использованием УЗ и последующим удалением органических растворителей (упариванием в вакууме) и воды (лиофилизацией). Продукты (лиофилизаты) содержали от 2.65 до 5.15 мас. % силибина. В табл. 1 приведены количества загруженных компонентов, растворителей и энергия УЗ. Выход продуктов составлял от 85 до 93%.

Для достижения необходимых характеристик полимерных частиц с силибином был проведен ряд экспериментов по использованию в качестве неводной (органической) фазы чистого этилацетата и смеси этилацетат–дихлорметан (2.25 : 1 об./об.), плотность которой близка к 1 г/мл (табл. 1). Полимер PLGA растворим в обоих органических растворителях, силибин нерастворим в дихлорметане и умеренно растворим в этилацетате (при нагревании). Использование одного этилацетата приводило к формированию примесной фракции микронного размера в образцах SN-06 и SN-16 при эмульгировании с энергией УЗ 200 и 50 Дж соответственно. В смеси растворителей этилацетат–дихлорметан микро-частицы образовывались при энергии УЗ 200 Дж

(образец SN-08) и отсутствовали при 50 Дж (образцы SN-14, SN-15, SN-17).

Отметим, что близкие значения плотностей водной и неводной фаз в случае использования смеси этилацетат–дихлорметан облегчают образование стабильной и однородной эмульсии (типа О/В). При этом в процессе эмульгирования происходит частичное растворение органической фазы в водной, что также может способствовать устойчивости эмульсии в момент получения. Стадия эмульгирования является в данном случае критической, поскольку происходит формирование частиц, нагруженных силибином. При последующем удалении органических растворителей образуется однородная суспензия полимерных частиц. Таким образом, использование неводной фазы, образованной смесью этилацетата и дихлорметана, оказалось предпочтительным.

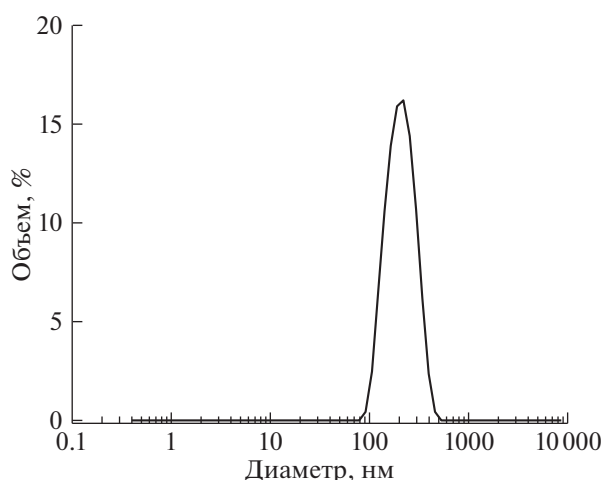
Высокие значения содержания силибина (5.15 мас. %) и эффективности включения в полимерные частицы (97%) при отсутствии примеси микро-частиц были определены в образце SN-17 (табл. 2). Способ его получения приведен в патенте [29].

На рис. 2 приведены спектры поглощения растворов силибина и образца SN-17 в ДМСО, подтверждающие присутствие силибина в составе полимерной композиции.

Водные суспензии четырех образцов (SN-08, SN-14, SN-15 и SN-17) имели средний размер частиц ~200 нм, индекс полидисперсности – менее 0.2 (табл. 2). На рис. 3 приведено объемное распределение частиц по размерам в суспензии образца SN-17.

Сферическая форма частиц и их размеры в диапазоне 200–300 нм были подтверждены с помощью крио-ПЭМ. На рис. 4 представлено изображение частиц образца SN-17.

Применение хлорида натрия в качестве инертного наполнителя и криопротектора при получении ПКС было связано с тем, что его присутствие приводит к низкому накоплению электростатического заряда в получаемом лиофилизате. Это важно для его дозирования и быстрой ресуспен-

**Рис. 3.** Распределение частиц по размерам (объемное) в водной суспензии образца SN-17.

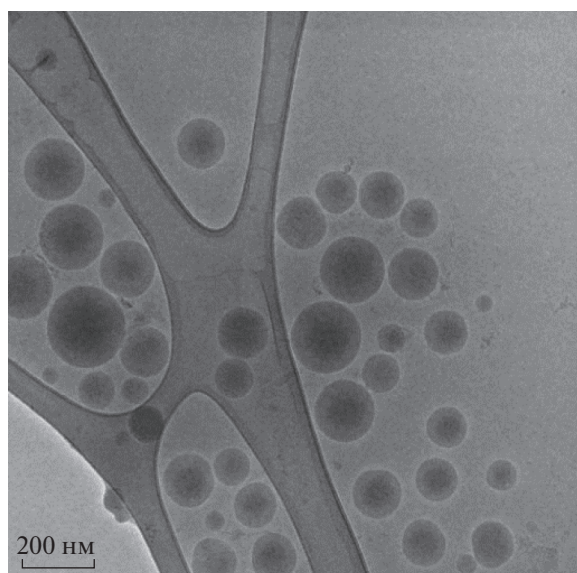


Рис. 4. Крио-ПЭМ-изображение частиц образца SN-17.

дируемости в водных средах. Хлорид натрия использовался ранее при получении полимерных композиций, содержащих иные фармацевтические субстанции (доцетаксел, кетопрофен) [30, 31]. ζ -потенциалы частиц полученных образцов ПКС были близки по значению и находились в диапазоне от -1.5 до -4.7 мВ (табл. 2), это обусловлено присутствием электролита (NaCl). На рис. 5 приведено распределение ζ -потенциала частиц в суспензии образца SN-17.

Антиоксидантная активность. При прямом определении САОА кулонометрическим методом с электрогенерированным галогеном-титрантом происходит окисление бромид-ионов в кислой среде на платиновом электроде с образованием Br_2 , Br_3^- , а также короткоживущих радикалов брома, адсорбированных на поверхности платинового электрода. Электрогенерированный бром вступает в реакции окисления, электрофильного присоединения по кратным связям и замещения в ароматическое кольцо в реакциях с антиоксидантами. В случае флавоноидов в первую очередь протекают реакции окисления гидроксильных групп с образованием соответствующих хинонов [32].

В табл. 3 представлены данные по оценке показателей САОА свободного силибина (субстанции) и композиции полимерных частиц, нагруженных силибином, кулонометрическим методом. Было установлено, что антиоксидантная активность ПКС, содержащей около 5% силибина (образец SN-17), составляла ~60% от активности свободного силибина (субстанции). Отметим, что полимер-носитель (PLGA) не обладал антиоксидантной активностью.

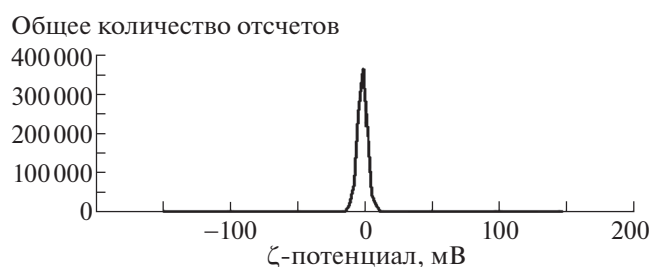


Рис. 5. Распределение ζ -потенциала частиц в водной суспензии образца SN-17.

АОА полимерных частиц с силибином оценивали косвенным методом по способности ингибировать неферментативное автоокисление адреналина [27]. Известно, что данный процесс происходит в щелочной среде с образованием адренохрома и супероксид анион-радикала [33, 34]. Препараты с антиоксидантными свойствами инактивируют супероксид анион-радикалы, ингибируя описанную реакцию, и по степени торможения образования окрашенного продукта (адренохрома) можно оценивать их АОА [35]. Показатель АОА рассчитывали как относительную величину из соотношения оптических плотностей при длине волны 347 нм для конкретных временных точек реакции автоокисления адреналина. Результаты, представленные в табл. 4, показывают, что силибин в составе полимерных частиц (образец SN-17) имел высокую АОА и вызывал ингибирование процесса автоокисления адреналина во всем временном интервале. Силибин (в виде субстанции) обладал менее выраженными антиоксидантными свойствами и в начальный период реакции (1–5 мин) проявлял в 2–3 раза меньшую активность по сравнению с силибином в составе полимерной композиции. Возможно, это связано с тем, что определение показателя АОА проводилось с использованием образцов, суспендированных в водной среде, а растворимость свободного силибина в воде очень низкая [11]. Таким образом, повышение растворимости силибина в водной среде с помощью включения в состав субмикронных частиц на основе PLGA позволяет повысить антиоксидантное действие ПКС.

Различные данные по АОА образцов, полученные прямым и косвенным методами, позволяют сделать оценку величины в целом и выявить характер развития антиоксидантного действия. Результаты определения САОА кулонометрическим методом показали его высокий уровень для полимерных частиц с силибином, сравнимый со свободным силибином (табл. 3). Косвенный метод, основанный на процессе ингибирования автоокисления адреналина, демонстрирует различную динамику проявления АОА сравниваемых

препаратов во времени и более высокую активность полимерных частиц, содержащих силибин (табл. 4).

Гепатопротекторное действие силибина в составе полимерных частиц изучали с помощью модели токсического CCl_4 -индуцированного гепатита, в основе которого лежат свободнорадикальные окислительные механизмы. Известно, что метаболизм CCl_4 в микросомах гепатоцитов с участием цитохрома P450 приводит к образованию трихлорметильного ($\text{CCl}_3\cdot$) и трихлорметилпероксильного ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$) радикалов, инициирующих процессы перекисного окисления липидов, повреждения мембран и биомолекул [36, 37]. Индуцированный четыреххлористым углеродом окислительный стресс проявляется подавлением активности мембраносвязанных ферментов, выходом цитозольных ферментов в кровь, некрозом гепатоцитов (синдром цитолиза), а также нарушением синтеза, секреции и оттока желчи (синдром холестаза).

Проведенное изучение состояния животных в группе с интоксикацией CCl_4 выявило повышение активности ферментов АЛТ в 6.7 раза и АСТ в 1.5 раза по сравнению с контрольной группой, что указывает на развитие синдрома цитолиза гепатоцитов, а также повышение активности ЩФ в 4 раза, указывающее на развитие синдрома холестаза (табл. 5). Описанные изменения биохимических показателей крови подтверждают формирование токсического повреждения печени у животных. Кроме того, формирование модели токсического гепатита с преимущественным разрушением гепатоцитов (синдром цитолиза) подтверждает значение коэффициента де Ритиса (соотношение активностей сывороточных АСТ/АЛТ): так как уровень АЛТ повышается в большей степени, чем уровень АСТ, то значение коэффициента де Ритиса снижается ниже нормальных значений – до 0.35 (в норме 1.33 ± 0.42 [38]).

Результаты исследования биохимических показателей в группе животных с четырехкратным пероральным введением полимерных частиц с силибином, предшествующим интоксикации CCl_4 , выявили снижение уровней активности АЛТ на 25% ($p < 0.05$), АСТ на 11% и ЩФ на 43% ($p < 0.05$) по сравнению с группой с введением только CCl_4 (табл. 5), что свидетельствует о снижении выраженности синдромов цитолиза и холестаза. Однако данные показатели оставались на более высоком уровне по сравнению с контролем. Отметим, что в группе животных с четырехкратным введением силибина, предшествующим интоксикации CCl_4 , показатели активности аминотрансфераз были близки к значениям группы животных, получавших CCl_4 без лечения, а уровень активности ЩФ стал ниже на 12%.

Таким образом, результаты исследования гепатопротекторной активности силибина *in vivo* в составе полимерных частиц при профилактическом четырехкратном пероральном введении при CCl_4 -индуцированном гепатите у мышей свидетельствуют о том, что композиция SN-17 способствует снижению степени токсического поражения печени по оцениваемым биохимическим показателям. При этом гепатопротекторный эффект ПКС был более выраженным по сравнению со свободным силибином, что, по-видимому, связано с повышением биодоступности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан способ получения полимерной композиции, содержащей силибин, на основе PLGA методом эмульгирования с использованием ультразвука. Содержание силибина в продукте ~5%, эффективность включения в частицы – выше 90%. Распределение частиц по размерам в водной суспензии композиции носило монодисперсный характер, средний диаметр частиц ~200 нм, индекс полидисперсности не превышал 0.2, ζ -потенциал находился в диапазоне $-1...-5$ мВ. Применение хлорида натрия в качестве наполнителя и криопротектора при получении продукта в виде лиофилизата улучшило его свойства. Показана высокая антиоксидантная активность силибина в составе полимерной композиции *in vitro* методом гальваностатической кулонометрии, а также по реакции неферментативного автоокисления адреналина. Полимерная композиция, содержащая силибин, при пероральном введении на модели CCl_4 -индуцированного гепатита мышей проявила более выраженное гепатопротекторное действие по сравнению со свободным силибином.

Авторы выражают благодарность Е.В. Ястремскому за получение изображений полимерных частиц методом крио-ПЭМ в ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abenavoli L., Capasso R., Milic N., Capasso F.* // *Phytother. Res.* 2010. V. 24. № 10. P. 1423. <https://doi.org/10.1002/ptr.3207>
2. *Federico A., Dallio M., Loguercio C.* // *Molecules.* 2017. V. 22. № 2. P. e191. <https://doi.org/10.3390/molecules22020191>
3. *Loguercio C., Festi D.* // *World J. Gastroenterol.* 2011. V. 17. № 18. P. 2288. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i18.2288>
4. *Ferenci P., Scherzer T.-M., Kerschner H. et al.* // *Gastroenterology.* 2008. V. 135. № 5. P. 1561. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.072>

5. *Kheong C.W., Mustapha N.R.N., Mahadeva S.* // Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2017. V. 15. № 12. P. 1940. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.04.016>
6. *Surai P.* // Antioxidants. 2015. V. 4. № 1. P. 204. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>
7. *Dehmlow C., Murawski N., de Groot H.* // Life Sci. 1996. V. 58. № 18. P. 1591. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00134-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00134-8)
8. *Polachi N., Bai G., Li T. et al.* // Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 123. P. 577. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.070>
9. *Куркин В.А., Рыжов В.М., Бирюкова О.В. и др.* // Химико-фармацевтический журнал. 2009. V. 43. № 2. P. 33. <https://elibrary.ru/item.asp?id=23108233>
10. *Woo J.S., Kim T.-S., Park J.-H., Chi S.-C.* // Arch. Pharm. Res. 2007. V. 30. P. 82. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17328246>
11. *Biedermann D., Vavříková E., Cvak L., Křen V.* // Nat. Prod. Rep. 2014. V. 31. № 9. P. 1138. <https://doi.org/10.1039/C3NP70122K>
12. *Bijak M.* // Molecules. 2017. V. 22. № 11. P. E1942. <https://doi.org/10.3390/molecules22111942>
13. *Di Costanzo A., Angelico R.* // Molecules. 2019. V. 24. № 11. P. E2155. <https://doi.org/10.3390/molecules24112155>
14. *Javed S., Kohli K., Ali M.* // Altern. Med. Rev. 2011. V. 16. № 3. P. 239. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21951025>
15. *Полтавец Ю.И., Кузнецов С.Л., Тубашева И.А. и др.* // Российские нанотехнологии. 2021. Т. 16. № 2. С. 149. <https://doi.org/10.1134/S1992722321020102>
16. *Bonepally C.R., Gandey S.J., Bommineni K. et al.* // Trop. J. Pharm. Res. 2013. V. 12. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i1.1>
17. *Das S., Roy P., Pal R. et al.* // PloS One. 2014. V. 9. № 7. P. e101818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101818>
18. *Терещенко О.Г., Никольская Е.Д., Жунина О.А. и др.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2018. Т. 67. № 12. С. 2290. <https://elibrary.ru/item.asp?id=36818310>
19. *Lee J.-S., Hong D.Y., Kim E.S., Lee H.G.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2017. V. 154. P. 171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.004>
20. *Makadia H.K., Siegel S.J.* // Polymers (Basel). 2011. V. 3. № 3. P. 1377. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
21. *Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2010. V. 75. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
22. *Ферубко Е.В., Зеленков В.Н., Лапин А.А., Даргаева Т.Д.* // Химия растительного сырья. 2020. № 4. С. 187. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020047750>
23. *Зеленков В.Н., Лапин А.А.* Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. МВИ-01-00669068. ВНИИ овощеводства, Верей, 2013. 19 с.
24. ТУ 9369-141–04868244-07. Рутин — стандартный образец. Технические условия.
25. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. Методы количественного определения витамина в лекарственных формах. 10. Определение содержания рутина (витамина Р). МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1989. С. 56.
26. Мода в статистике. <https://statanaliz.info/statistika/opisanie-dannykh/moda/>
27. *Супота Т.В.* // Вопросы медицинской химии. 1999. Т. 45. № 3. С. 263. <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-1999-45-3-263>
28. European Convention ETS 123 for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986.
29. *Лукасова Н.В., Кузнецов С.Л., Тубашева И.А. и др.* Способ получения полимерсодержащей композиции силибина. Патент № 2716706 (Россия), 2019.
30. *Poltavets Y.I., Zavarzina V.V., Kuznetsov S.L. et al.* // J. Reports Pharm. Sci. 2019. V. 8. № 2. P. 253. https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_64_19
31. *Полтавец Ю.И., Воронцов Е.А., Заварзина В.В. и др.* Противовоспалительный препарат на основе кетопрофена и способ его получения. Патент РФ № 2694221 (Россия), 2018.
32. *Низамова А.М., Зиятдинова Г.К., Будников Г.К.* // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 3. С. 308. <https://elibrary.ru/item.asp?id=15609017>
33. *Bors W., Michel C., Saran M., Lengfelder E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 540. № 1. P. 162. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90445-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90445-2)
34. *Misra H.P., Fridovich I.* // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 10. P. 3170.
35. *Супота Т.В.* // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 6. С. 650. <https://doi.org/10.18097/PBMC20166206650>
36. *Manibusan M.K., Odin M., Eastmond D.A.* // J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2007. V. 25. № 3. P. 185. <https://doi.org/10.1080/10590500701569398>
37. *Weber L.W.D., Boll M., Stampfl A.* // Crit. Rev. Toxicol. 2003. V. 33. № 2. P. 105. <https://doi.org/10.1080/713611034>
38. Биохимия: Учебник / Ред. Е.С. Северин. 2-е изд., испр. М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004. С. 472.