

## АНТИАГРЕГАЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ, СОДЕРЖАЩИЙ ЛИПОЕВУЮ КИСЛОТУ С КАРНОЗИНОМ

Щелконогов В.А.<sup>1,2,3</sup>, Баранова О.А.<sup>2</sup>, Чеканов А.В.<sup>2</sup>, Казаринов К.Д.<sup>3</sup>, Шастина Н.С.<sup>1</sup>,  
Стволинский С.Л.<sup>4</sup>, Федорова Т.Н.<sup>4</sup>, Соловьева Э.Ю.<sup>2</sup>, Федин А.И.<sup>2</sup>, **Сорокоумова Г.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (ИТХТ)

*пр. Вернадского, 86, г. Москва, 119571, РФ; e-mail: vasily9999@yandex.ru*

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

*ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ*

<sup>3</sup> ФГБУН Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

*пл. Введенского, 1, г. Фрязино, 141190, РФ*

<sup>4</sup> ФГБНУ «Научный центр неврологии»,

*Волоколамское шоссе, 80, г. Москва, 125367, РФ*

Поступила в редакцию: 03.07.2020

**Аннотация.** Были подобраны оптимальные условия для получения липосомального препарата, содержащего карнозин с липоевой кислотой. Используя методы активной и пассивной загрузки удалось добиться достаточно высокой степени включения липоевой кислоты (ЭВ = 69%) и карнозина (ЭВ = 56%) в липосомы. Было обнаружено, что добавление холестерина или сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению эффективности включения карнозина в наночастицы (ЭВ = 31-38%). Получение ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному (3-х кратному) уменьшению степени включения карнозина (ЭВ = 16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась (ЭВ = 58-69%). Было установлено, что полученные липосомы представляют однородную систему наночастиц с размером 185 – 260 нм. Методом электронной микроскопии была изучена морфология наночастиц. Было обнаружено, что липосомы с ЛК+Карн. представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических наночастиц размером 150 – 250 нм, а пустые ФХ-липосомы образуют небольшие агрегаты. Следует отметить, что полученные липосомальные препараты стабильны в течение длительного хранения при комнатной температуре и не образуют никаких агрегатов. Оценено влияние полученных липосомальных препаратов на агрегацию тромбоцитов (Тц), индуцированную арахидоновой кислотой (АК). Обнаружено, что липосомальный препарат, содержащий ЛК и карнозин, подавляет агрегацию Тц на 50-60%, относительно контроля (Тц+АК), в то время как пустые ФХ-липосомы и водорастворимые формы препаратов Карн и ЛК практически не влияют на агрегацию Тц, вызванную этим индуктором.

**Ключевые слова:** липосомы, карнозин, липоевая кислота, тромбоциты, арахидоновая кислота.

**Принятые сокращения:** ЛК – липоевая кислота, Карн. – карнозин, ФХ – фосфатидилхолин, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, Хол. – холестерин, ЭВ – эффективность включения, МЛВ – мультиламеллярные везикулы, ОЛВ – одноламеллярные везикулы, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, Тц – тромбоциты, МДА – малоновый альдегид, ТБК-АП – ТБК-активные продукты, АК – арахидоновая кислота, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер.

### ВВЕДЕНИЕ

Сосудистые заболевания головного мозга занимают второе место среди всех причин инвалидизации и смерти во всем мире, уступая сердечно-сосудистым патологиям. Особо важен фактор ишемии при развитии хронических нарушений мозгового кровообращения, вследствие чего образуется сосудистая деменция. Поэтому ишемический инсульт следует рассматривать в качестве ключевого патогенетического фактора развития самых разнообразных нозологических форм в рамках сосудистой патологии головного мозга и, в первую очередь, ишемического инфаркта мозга [1].

Сама по себе ишемия головного мозга является пусковым фактором развития чрезвычайно многообразного комплекса патобиохимических реакций, которые приводят к гипоксии (кислородному голоданию) и, в последствие к процессам дегенерации и гибели нейронов в результате нарушения механизмов ауторегуляции мозгового кровообращения. К наиболее важным патогенетическим механизмам развития ишемического инфаркта головного мозга относят [2]: нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, воспалительные реакции, аутофагию и деструкцию ГЭБ.

Иностранские и отечественные научные публикации по данной теме [3,4] показывают, что одним из наиболее перспективных и широко применяемых в медицине антиоксидантов при комплексной терапии ишемии головного мозга в настоящее время является альфа-липоевая кислота (ЛК). На экспериментальных моделях ишемического инсульта у крыс было показано нейропротекторное действие ЛК, связанное с подавлением

количества малинового альдегида (МДА – основанного биохимического маркера ишемического повреждения, который является продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ)) и концентрации активных форм кислорода, и с повышением активности супероксиддисмутазы и каталазы в тканях головного мозга [5-7]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что липоевая кислота подавляет агрегацию тромбоцитов (Тц), снижает уровни кальция и тромбосана В2 при активации данных клеток коллагеном и арахидоновой кислотой [8,9].

Другим эффективным антиоксидантом является карнозин (Карн.). Карнозин ( $\beta$  - аланил-L-гистидин) - это первый пептид, который был когда-либо выделен из природного материала [10]. Данный дипептид содержится в больших количествах в мышечной и нервной ткани. Карнозин может достигать очень высокой концентрации в скелетных мышцах человека (до 20 mM). Демонстрация антиоксидантного антиишемического, репаративного, антикатарактального действия дипептида в конце 20-ого века привела к большому интересу со стороны медицинского научного сообщества к карнозину. [11]. Карнозин является эффективным хелатором ионов металлов, таких как цинк, который требуется для активности матриксных металлопротеиназ. На экспериментальных моделях ишемии у животных было установлено, что карнозин хорошо переносится (усваивается) и является надежным защитником нейронов [12]. Y. Shen и др. [13] на модели инсульта мышей показали, что карнозин уменьшает эксцитотоксичность глутамата, что приводит к уменьшению размера инфаркта и улучшению неврологических функций. В другом исследовании [14] было выявлено, что данный дипептид не только уменьшает размер инфаркта, но и подавляет активность ММП и уровни активных форм кислорода (АФК). Он также легко проникает через ГЭБ, что позволяет его применять даже на ранних стадиях инсульта.

Однако оба этих антиоксиданта (липовая кислота, и карнозин) обладают рядом недостатков. Основными недостатками ЛК являются её очень низкая растворимость в воде, быстрое связывание с различными белками и быстрая биодegradация под действием различных ферментов [15], что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. Полная деградация в кровотоке происходит менее чем за час. В результате чего при терапии различных патологий пациентам вводят препараты, содержащие ЛК, в больших дозах и в течение длительного времени, для достижения её терапевтического эффекта. В наше время, как правило, практикуется внутривенное введение ЛК. Карнозин также вводят в больших дозах, т. к. он быстро биодegradирует в организме под действием фермента карнозиныазы.

Создание новых лекарственных форм данных препаратов с целью адресной доставки в и улучшения антиоксидантного, антиагрегационного и терапевтического действия является актуальной проблемой в наше время. Одним из подходов решения данной проблемы служит создание комбинированного препарата, содержащего одновременно липовую кислоту и карнозин, путём включения их в липосомы. Кроме того, липосомы способны проникать через гематоэнцефалический барьер, что также является очень важным для доставки этих препаратов в мозг.

**Целью данной работы** является получение липосомальной формы, содержащей карнозин и липовую кислоту, и исследование её влияния на агрегацию тромбоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Материалы.*

В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 94% чистоты, выделенный из бобов сои («LipoidGmbH», Германия); Липовую кислоту, карнозин, холестерин («Sigma-Aldrich», США); арахидоновую кислоту (Helena Biosciences Europe, США); хлороформ, хлорид натрия (0,9%), этиловый спирт, сульфат аммония (Химмед, Россия).

### *Методы.*

Для получения липосом использовали миниэкструдер «LiposoFast basic» («Avestin», США), использованием фильтров «Whatman» (США) с размером пор 100, 200 нм.

Гель-фильтрацию проводили на колонке illustra NAP-5 с сорбентом Sephadex G25 Medium. Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре SHIMADZU UV-1601, P/N 206-67001 (Япония). Для определения размеров частиц методом динамического светорассеяния использовали прибор Delsa Nano C («Beckman Coulter Inc.», США).

### *Получение липосомального препарата, содержащего липовую кислоту с карнозином.*

Смесь ФХ (40 мг) и ЛК (5 мг) растворяли в 5 мл этанола, затем реакционную смесь упаривали, растворяли в сульфате аммония ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 М в 1 мл растворе NaCl (0,9%)). Одноламеллярные везикулы получали методом экструзии. Затем липосомы разделяли от сульфата аммония методом гель фильтрации и добавляли к липосомам водный раствор карнозина (1 мл) с концентрацией 20 мг/мл, при нагревании при температуре 60°C и перемешивали в течении 30 минут. Степень включения субстанций в липосомах определяли спектрофотометрическим методом.

### *Выделение обогащённой тромбоцитами плазмы*

Эксперименты проводили *in vitro* на обогащённой тромбоцитами плазме, выделенной из крови, полученной у здоровых доноров. У всех участников было получено добровольное согласие на взятие биоматериала. Обогащенную тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием крови в течение 12 мин при 132 g при комнатной температуре. Затем отбирали супернатант, осадок центрифугировали в течение 15 мин при 850 g для получения обеднённой тромбоцитами плазмы (ОТП).

*Метод исследования процесса агрегации тромбоцитов*

В образцы с ОТП ( $V=225$  мкл), добавляли «пустые» ФХ липосомы, или комбинированный липосомальный препарат ЛК+карнозин, или липосомы с ЛК, или с карнозином, или их водорастворимые формы ( $V=20$  мкл), инкубировали в течение 5 мин при  $T=37^{\circ}\text{C}$ . Затем добавляли индуктор агрегации Тц арахидоновую кислоту ( $V=25$  мкл,  $C=1$  мг/мл). Агрегатограмму регистрировали на четырехканальном агрегометре «Helena AggRAM» (США) в течение 10 минут.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Даная работа посвящена разработке липосомальной формы, содержащей одновременно две субстанции: карнозин и липоевую кислоту. Эти оба вещества проявляют антиоксидантные свойства и применяются при различных патологиях, в том числе и при нейродегенеративных расстройствах. Для увеличения растворимости ЛК и защиты ЛК и Карн. от биодegradации под действием ферментов, нами предложено использовать их липосомальную форму.

Вначале подбирали оптимальные условия для максимально возможного включения Карн. и ЛК в липосомы, в том числе путем подбора метода загрузки и липидного состава липосом. Липосомы, содержащие ЛК и Карн., получали из природного липида соевого фосфатидилхолина (ФХ) или из смеси ФХ и холестерина, используя метод пассивной и активной загрузки. Размер частиц и индекс полидисперсности определяли методом динамического светорассеяния. Эффективность включения субстанций определяли спектрофотометрическим методом. Результаты проведенных экспериментов приведены в таблице 1.

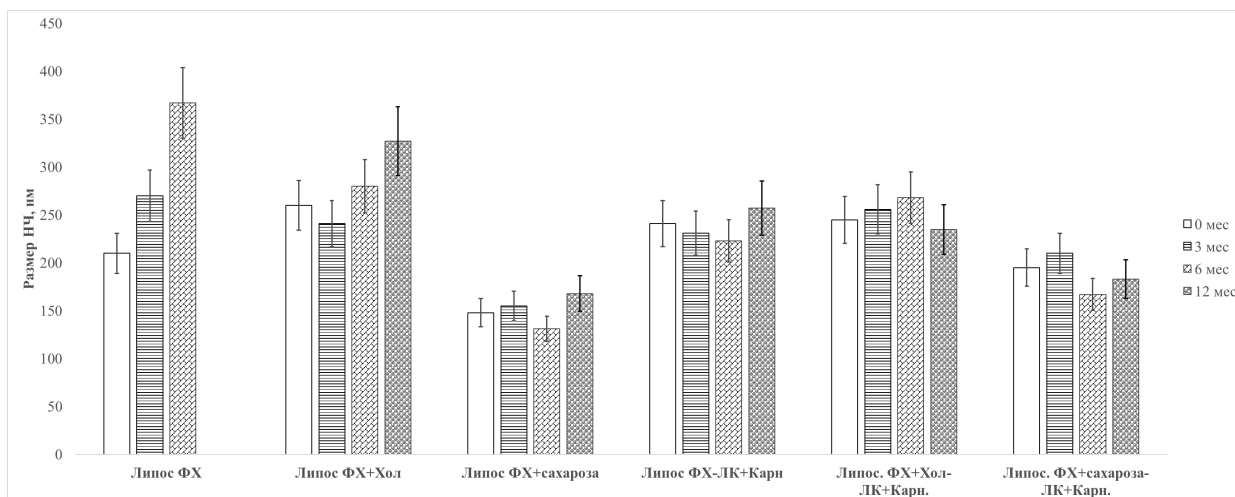
В результате проведенных исследований были получены липосомы с ЛК+Карн. на основе ФХ, ФХ+Хол., и ФХ с сахарозой с размером НЧ равным 185-260 нм. Значения индекса полидисперсности полученных липосом были меньше 0,3, что подтверждало гомогенность данных наносuspensions. Необходимо отметить, что размеры и ИП полученных наночастиц не отличались при вариации методов их получения. Вместе с этим было установлено, что при получении ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки происходило уменьшение степени включения карнозина ( $\text{ЭВ} = 16\%$ ) в липосомы. При этом получение липосом, содержащих ЛК и Карн. одновременно активной загрузкой привело к значительному увеличению эффективности включения карнозина в липосомы ( $\text{ЭВ} = 56\%$ ). Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы ( $\text{ЭВ} = 31-38\%$ ). Тем временем эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов пассивной и активной загрузки практически не изменилась ( $\text{ЭВ} = 58-69\%$ ). Более того полученные липосомы, содержащие ЛК и Карн., были стабильными при длительном хранении при комнатной температуре (рис. 1).

С помощью метода электронной сканирующей микроскопии была изучена морфология липосом, содержащих карнозин с липоевой кислотой. Было показано, что липосомы с ЛК+Карн. представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических НЧ с размером 150-250 нм (рис. 2, Б – Г). Однако пустые ФХ-липосомы также имеют сферическую форму, но образуют небольшие агрегаты (рис. 2, А).

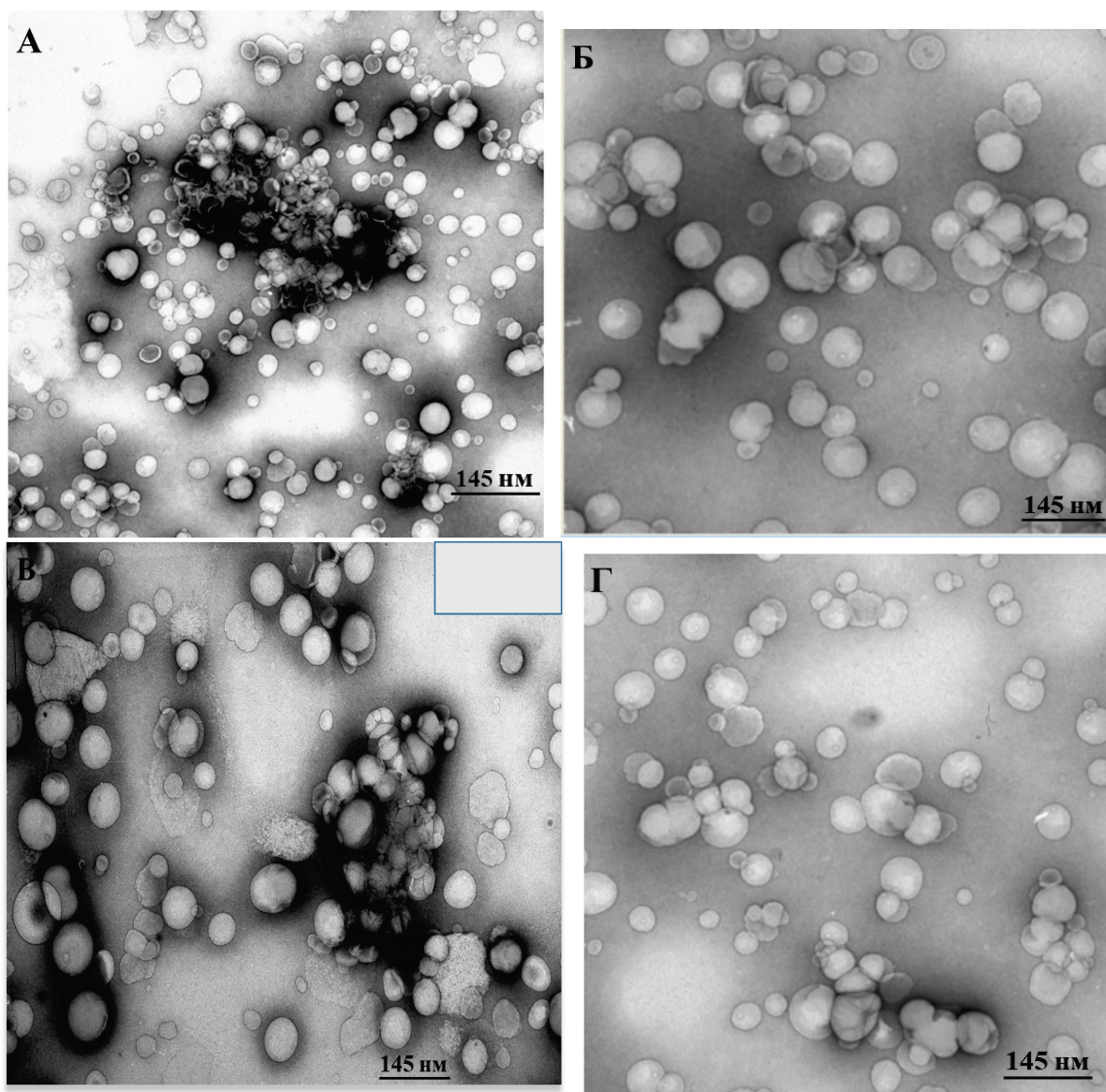
На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных липосомальных форм антиоксидантов на функциональную активность тромбоцитов в условиях индукции агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, полученных от условно здоровых доноров. Оценивалось влияние полученных ФХ-липосом с ЛК + Карн. на функциональную активность тромбоцитов в сравнении с контролями: Тц+АК, ФХ-липосомами, не содержащими ЛК и растворами Карн. и ЛК в фосфатном буферном растворе с рН 7.4. Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 3.

**Таблица 1.** Характеристики липосом, содержащих одновременно липоевую кислоту с карнозином

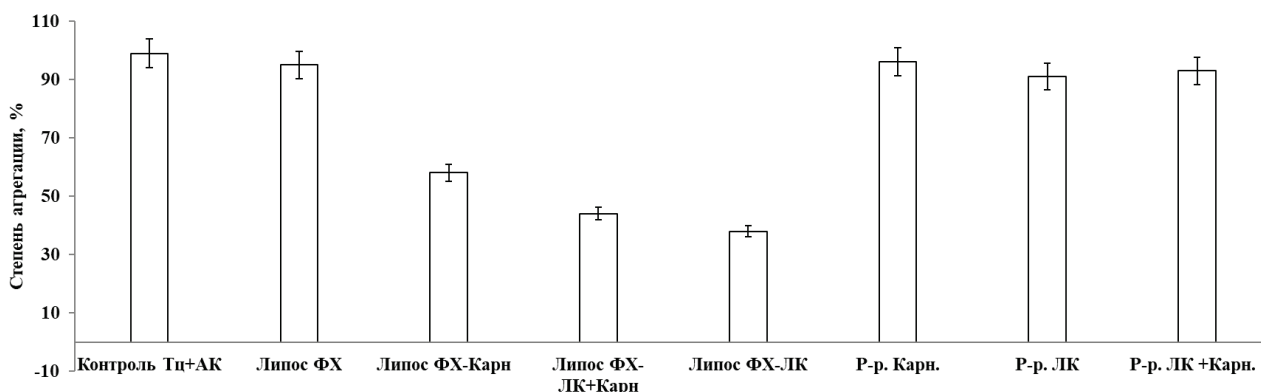
Состав липосом Слипидов= 40мг/мл	Лекарственное вещество		рН среды	ЭВ, %		Средний ИП	Размер частиц, нм
	ЛК Сисх., мг/мл	Карнозин Сисх., мг/мл		ЛК	Карнозин		
<b>пассивная загрузка</b>							
ФХ	5	20	7.4	57±10	16±5	0,054±0,023	245±10
<b>активная загрузка</b>							
ФХ	5	20	7.4	69±10	56±10	0,102±0,007	235±10
ФХ+Хол.	5	20	7.4	62±10	31±10	0,131±0,071	245±10
ФХ+сахароза	5	20	7.4	58±10	38±10	0,078±0,053	195±10



**Рисунок 1.** Размер липосом, содержащих ЛК и Карн, в течение длительного хранения при комнатной температуре. (Липос ФХ-ЛК+Карн; Липос ФХ+Хол-ЛК+Карн; Липос ФХ+сахароза-ЛК+Карн: Сфх = 40 мг/мл, Схол = 4 мг/мл %, Слк. = 5 мг/мл, Скарн. = 20 мг/мл)



**Рисунок 2.** Электронные микрофотографии липосом: А – Липос ФХ; Б – Липос ФХ-ЛК+Карн; В – Липос ФХ+Хол-ЛК+Карн; Г – Липос ФХ+сахароза-ЛК+Карн. (Липос ФХ-ЛК+Карн; Липос ФХ+Хол-ЛК+Карн; Липос ФХ+сахароза-ЛК+Карн: Сфх = 40 мг/мл, Схол = 4 мг/мл %, Слк. = 5 мг/мл, Скарн. = 20 мг/мл).



**Рисунок 3.** Влияние липосомальных и водорастворимых препаратов (ЛК, Карн., ЛК+Карн.) на агрегацию тромбоцитов человека (здоровые доноры,  $n=20$ ,  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл), вызванную арахидоновой кислотой. (Липос ФХ+АК; Липос ФХ-Карн.; Липос ФХ-ЛК; Липос ФХ-ЛК + Карн.; P-р. Карн.; P-р. ЛК; P-р. ЛК + Карн.: Сфх = 4 мМ; Слк = 1,7 мМ Скарн = 2,5 мМ)

В результате проведенных исследований было установлено (Рис.2), что липосомы, содержащие ЛК (Слк = 1,7 мМ) и Карн (Скарн = 2,5 мМ), подавляют агрегацию Тц, обусловленную арахидоновой кислотой, на 50% относительно контроля (Тц+АК). Вместе с этим, было показано, что липосомы с ЛК (Слк = 1,7 мМ) и с Карн. (Скарн = 2,1 мМ) уменьшают степень агрегации тромбоцитов, индуцированную АК на 67 и 38%, соответственно. Однако, как и ФХ-липосомы, не содержащие лекарственных препаратов, так и водорастворимые формы препаратов липоевой кислоты и карнозина, практически не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором. Вероятнее всего, что водорастворимые препараты липоевой кислоты и карнозина обладают низкой способностью к проникновению в клетки. Липосомы, содержащие ЛК или Карн, а также липосомальный препарат, включающий ЛК и Карн, по-видимому, способны проникать через клеточную мембрану за счет слияния липосом с мембраной тромбоцитов или за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом были подобраны оптимальные условия для получения липосомального препарата, содержащего карнозин с липоевой кислотой. С помощью методов активной и пассивной загрузки удалось добиться достаточно высокой степени включения липоевой кислоты (ЭВ = 69%) и карнозина (ЭВ = 56%) в липосомы. Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению эффективности включения карнозина в наночастицы (ЭВ = 31-38%). Получение ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному 3-х кратному уменьшению степени включения карнозина (ЭВ = 16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась (ЭВ = 58-69%). Необходимо отметить, что полученные липосомальные препараты представляют с собой однородную систему наночастиц с размером 185 – 260 нм. Методом электронной микроскопии была изучена морфология липосомальных препаратов. Было обнаружено, что что липосомы с ЛК+Карн. представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических НЧ с размером 150-250 нм, а пустые ФХ-липосомы образуют небольшие агрегаты. Тем не менее было установлено, что полученные липосомальные препараты стабильны в течение длительного хранения при комнатной температуре и не образуют никаких агрегатов НЧ.

Изучение влияния, комбинированного липосомального препарата, содержащего и Карн с ЛК на агрегацию тромбоцитов, выделенных из крови, полученной от условно здоровых доноров показало, что липосомальный препарат, содержащий Карн с ЛК, ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой на 50%. Важно отметить что водорастворимые препараты карнозина и липоевой кислоты никак не влияли на агрегацию тромбоцитов, обусловленную арахидоновой. Вероятно, это связано с плохой способностью проникать в клетку этих препаратов, тогда как липосомальный комбинированный препарат более легко проникает через клеточную мембрану путём её слияния с мембраной тромбоцита или за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Таким образом, нами получен эффективный комплексный препарат, содержащий два антиоксиданта и проявляющий антиагрегационные свойства в отношении тромбоцитов человека.

*Авторы выражают благодарность Абдулджаббар Балсам Тарек за получение липосомальных препаратов, руководителю организации представительства компании "ЛИПОИД АГ" (Германия), г. Москва, к.х.н., Сьмону Андрею Валентиновичу, за предоставление фосфатидилхолина Lipoid S-100.*

### Список литературы / Reference

1. Бурчинский С.Г. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции. *Статьи института геронтологии АМН Украины*, 2006, т. 14, с. 15-18. [Burchinsky S.G. Brain ischemia: the

possibilities of complex pharmacological correction. *Articles of the Gerontology Institute of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 2006, vol. 14, pp. 15-18. (In Russ.)]

2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. *Ишемия головного мозга*. М.: Медицина, 2001, 328 с. [Gusev E.I., Skvortsova V.I. *Cerebral ischemia*. M.: Medicine, 2001, 328 p. (In Russ.)]

3. Соловьева Э.Ю., Миронова О.П., Баранова О.А. и др. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при ишемии головного мозга. *Журн. неврол. и психиат.*, 2008., т. 108, № 6, с. 88-94. [Solovieva E.Yu., Mironova O.P., Baranova O.A. et al. Free-radical processes and antioxidant therapy for cerebral ischemia. *Zhurn. nevrol. and psychiatr.*, 2008., vol. 108, no. 6, pp. 88-94. (In Russ.)]

4. Mitsui Y., Sahmelzer J.D., Zollman P.J. et al. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemic-reperfusion injury of peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*, 1999, vol. 163, pp. 11-16.

5. Clark W.M., Rinker L.G., Lessov N.S., Lowery S.L., Cipolla M.J. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. *Stroke*, 2001, vol. 32, pp. 1000-1004.

6. Deng H., Zuo X., Zhang J., Liu X., Liu L.I., Xu Q., Wu Z.  $\alpha$ -Lipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion induced injury in rats. *Molecular medicine REPORTS*, 2015, vol. 11, pp. 3659-3665.

7. Packer L., Tritschler H.J., Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.*, 1997, vol. 22, pp. 359-378.

8. Lai Y.S., Shih C.Y., Huang Y.F., Chou T.C. Antiplatelet activity of alpha-lipoic acid. *J Agric Food Chem.*, 2010, vol. 58, pp. 8596-8603.

9. Щелконогов В.А., Сорокумова Г.М., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д. и др. Липосомальная форма липоевой кислоты: получение и определение антиагрегационной и антиоксидантной активности. *Биомедицинская химия*, 2016, т. 5, с. 577-583. [Shchelkonogov V.A., Sorokumova G.M., Baranova O.A., Chekanov A.V., Kazarinov K.D., et al. Liposomal form of lipoic acid: preparation and determination of antiplatelet and antioxidant activity. *Biomedical chemistry*, 2016, vol. 5, pp. 577-583. (In Russ.)]

10. Castelletto V., Cheng G., Stain C., Connon C.J., Hamley I.W. Self-Assembly of a Peptide Amphiphile Containing L Carnosine and Its Mixtures with a Multilamellar Vesicle Forming Lipid. *Langmuir*, 2012, vol. 28, pp. 11599-11608.

11. Фадеева Д.А., Халикова М.А., Жилыкова Е.Т., Новиков О.О., Новикова М.Ю., Попов Н.Н., Сорокопудов В.Н. Аналитическая характеристика карнозина. *Серия Медицина. Фармация.*, 2010, т. 93, с. 179-184. [Fadeeva D.A., Khalikova M.A., Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Novikova M. Yu., Popov N.N., Sorokopudov V.N. Analytical characteristic of carnosine. *Series Medicine. Pharmacy.*, 2010, vol. 93, pp. 179-184. (In Russ.)]

12. Bae O.N., Serfozo K., Baek S.-H et al Safety and efficacy evaluation of carnosine, an endogenous neuroprotective agent for ischemic stroke. *Stroke*, 2013, vol. 44, pp. 205-212.

13. Shen Y.P., He Y.-Y. et al. Carnosine protects against permanent Cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, vol. 48, pp. 727-735.

14. Rajanikant G., Rajanikant G., Zemke D., Senut M.C. et al. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.*, 2007, vol. 38, pp. 3023-3031.

15. Akiba S., Matsugo S., Packer L., Konishi T. Assay of Protein-Bound Lipoic Acid in Tissues by a New Enzymatic Method. *Analytical biochemistry*, 1998, vol. 2, pp. 299-304.

## ANTIAGGREGATION EFFECT OF THE LIPOSOMAL FORM CONTAINING LIPOIC ACID WITH CARNOSINE

Shchelkonogov V.A.<sup>1,2,3</sup>, Baranova O.A.<sup>2</sup>, Chekanov A.V.<sup>2</sup>, Kazarinov K. D.<sup>3</sup>, Shastina N.S.<sup>1</sup>, Stvolinsky S.L.<sup>4</sup>, Fedorova T.N.<sup>4</sup>, Solovieva E.Y.<sup>2</sup>, Fedin A.I.<sup>2</sup>, Sorokoumova G.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MIREA – Russian technological University (ITHT)

*Vernadsky prospectus, 86, Moscow, 119571, Russia; e-mail: vasily9999@yandex.ru*

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)

*Ostrovitianov str., 1, Moscow, 117997, Russia*

<sup>3</sup> Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS

*Vvedensky sq., 1, Fryazino, 141190, Russia*

<sup>4</sup> Research Center of Neurology, Laboratory of Clinical and Experimental Neurochemistry

*Volokolavskoye Shosse, 80, Moscow, 125367, Russia*

**Abstract.** The optimal conditions were selected for obtaining the liposomal form, containing carnosine with lipoic acid. Using methods of active and passive loading, it was possible to achieve a sufficiently high efficiency inclusion of lipoic acid (EI = 69%) and carnosine (EI = 56%) into liposomes. It has been found that the addition of cholesterol or sucrose to PC liposomes led to a slight decrease of efficiency incorporation of carnosine into nanoparticles (EI = 31-38%). The preparation of PC liposomes with LA and carnosine by the method of passive loading led to a significant (3-fold) decrease in the efficiency inclusion of carnosine (EI = 16%) into liposomes. At the same time, the efficiency incorporating of LA into PC liposomes when using methods passive and active loading practically did not change (EI = 58-69%). It has been established that the obtained liposomes represent a homogeneous system of nanoparticles with the size of 185-260 nm. The method of electron microscopy was used to study the morphology of nanoforms. It has been found that liposomes with LA/Carn. represent a homogeneous system consisting mainly of spherical nanoparticles with a size of 150-250 nm, and empty PC liposomes form small aggregates. It should be noted that the obtained liposomal drugs are stable during long-term storage at room temperature and do not form any aggregates. The effect of the obtained liposomes on platelet (Pt) aggregation induced by arachidonic acid (AA) was evaluated. It has been revealed that the liposomes, containing LA and carnosine, suppresses platelet aggregation by 50-60%, relative to the control (Pt + AA), while empty PC liposomes and water-soluble forms of Carn and LA practically do not affect the Pt aggregation, caused by this inductor.

**Key words:** liposomes, carnosine, lipoic acid, arachidonic acid.