

## ИНИЦИИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВЫХ ЛИПОСОМ И ИЗМЕНЕНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК В ПРОЦЕССЕ ОКИСЛЕНИЯ

Сажина Н.Н., Пальмина Н.П., Плащина И.Г., Антипова А.С., Семенова М.Г.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
ул. Косыгина 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: Natnik48s@yandex.ru  
Поступила в редакцию: 19.07.2019

**Аннотация.** Изучена кинетика инициированного 2,2'-азобис(амидинопропан) дигидрохлоридом (ААРН) окисления липосом из соевого фосфатидилхолина (ФХ) при разных температурах и с добавлением в них альфа-линоленовой кислоты (АЛК), а также ингибирования окисления этих липосом введением в них эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и инкапсулированием их казеинатом натрия (КН). Методом динамического рассеяния света (ДСР) зарегистрирована динамика изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе их окисления. Результаты работы показали, что инициированное ААРН окисление липосом из соевого ФХ при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  можно достаточно эффективно (на 80-90%) ингибировать фенольными соединениями ЭМГ. При повышении температуры до  $60^{\circ}\text{C}$  в 4-5 раз увеличивается скорость окисления липосом, и ингибирование образования продуктов ПОЛ существенно уменьшается. Добавление в ФХ-липосомы АЛК приводит к ускорению окисления по сравнению с ФХ-липосомами. Инкапсулирование липосом казеинатом натрия снижает окисление липосом на 70%, а совместное действие его с ЭМГ – на 90%. С повышением температуры эффективность защитной функции казеиновой оболочки уменьшается. В процессе окисления при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  размер ФХ-липосом увеличивается на 6-7%, а абсолютное значение отрицательного z-потенциала увеличивается к концу окисления примерно в 3 раза. Введение в липосомы АЛК значительно влияет на динамику изменения их размеров и z-потенциала. Присутствие в липосомах ЭМГ стабилизирует размеры и z-потенциал в процессе окисления и для ФХ-липосом, и для липосом с АЛК. Комплекс ФХ-липосом с казеинатом натрия также приводит к стабилизации его размеров и z-потенциала.

**Ключевые слова:** липосомы, ПОЛ, фосфатидилхолин, эфирное масло гвоздики, казеин натрия, альфа-линоленовая кислота.

В настоящее время большой интерес вызывают работы по созданию и исследованию липосомных структур на основе соевого фосфатидилхолина (ФХ), как наноконтейнеров для доставки в ткани и клетки живых организмов различных функциональных нутрицевтиков: незаменимых полиненасыщенных  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 жирных кислот (ПНЖК), антиоксидантов (АО), витаминов, органических кислот и др. соединений [1, 2]. Липосомы ФХ служат также моделями для изучения биохимических процессов в мембранах живых клеток, в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ), и регулирования этого окисления различными субстанциями [3]. Благодаря наличию в ФХ ПНЖК, липосомы легко окисляются кислородом воздуха и разрушаются под воздействием света и высоких температур, поэтому требуют защиты от окисления и деградации при их длительном хранении и в разных экстремальных условиях, например, при производстве и переработке пищевых продуктов. Для предотвращения окисления, прежде всего, используют различные АО, вводимые в липосомы, среди которых перспективными являются жирорастворимые фенольные соединения, входящие в состав эфирных масел (ЭМ) пряно-ароматических растений. Было установлено [4], что при ингибировании автоокисления метиловых эфиров ПНЖК, выделенных из льняного масла, эфирными маслами 16-ти различных ароматических растений, наибольшую эффективность имеет эфирное масло гвоздики (ЭМГ). Помимо антиоксидантной защиты липосом от окисления, используют также инкапсулирование их различными биополимерами, которые не только предохраняют липосомы от окисления, но повышают их функциональность и растворимость в водной среде, что весьма важно для увеличения биодоступности содержащихся в них нутрицевтиков [5].

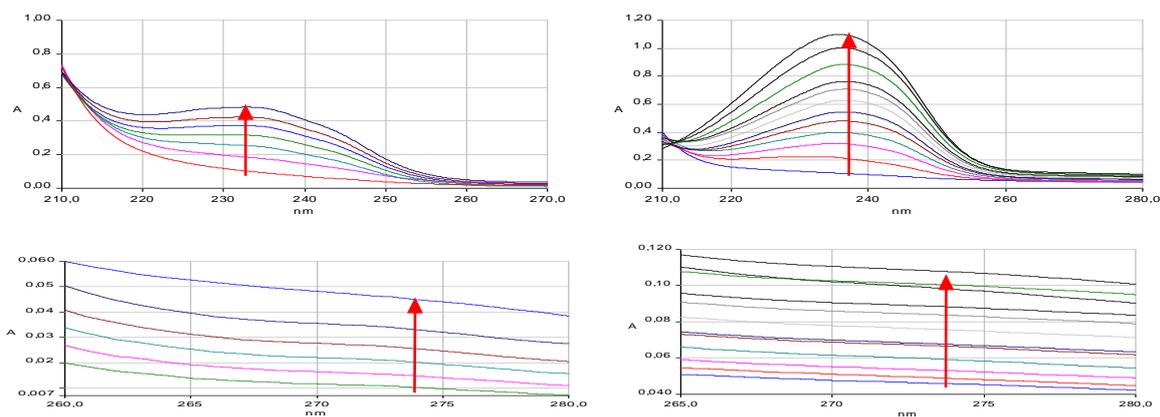
В представленной работе проведено изучение кинетики инициированного окисления липосом из соевого ФХ при разных температурах и с добавлением в них альфа-линоленовой кислоты (АЛК). Исследовано влияние на окисление липосом введения в них эфирного масла гвоздики (ЭМГ) и инкапсулирования их казеинатом натрия (КН). Изучена также динамика изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе окисления и влияние на нее ингибирующих и окисляющих агентов.

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого ФХ марки Lipoid S100 (фирмы Lipoid GmbH, Германия) в фосфатном буфере ( $\text{pH} = 7,2$ ,  $I = 0,001 \text{ M}$ ). Состав соевого ФХ по данным фирмы Lipoid следующий: фосфолипиды, г/100г: ФХ = 94 г, N-ацил-фосфатидилэтанолламин = 0,5, фосфатидилэтанолламин = 0,1, фосфатидилинозитол = 0,1, лизофосфатидилхолин = 3; неполярные липиды, г/100г: триглицериды = 2, свободные жирные кислоты = 0,5,  $\alpha$ -токоферол = 0,15. Соотношение жирных кислот в % к общему их количеству составило: пальмитиновая = 12-17; стеариновая = 2-5; олеиновая = 11-15; линолевая = 59-70; линоленовая = 3-7. Липосомы с концентрацией 1 мг/мл готовили из суспензии ФХ, добавляя в нее, если необходимо, ЭМГ (4,0% веса к весу ФХ) или ALA в пропорции ФХ:АЛК = 1:0,59 для достижения в липосомах соотношения  $\alpha$ -линоленовой и линолевой кислот ( $\omega$ -3: $\omega$ -6) = 1:1, учитывая жирнокислотный состав ФХ. Липосомы формировали с помощью

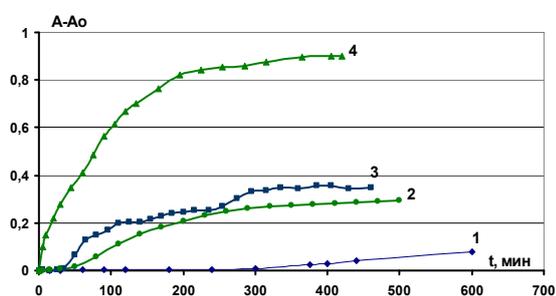
ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США), охлаждая их смесью воды со льдом для предотвращения окисления, после чего пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экструдер (AVANTI PolarLipid, США). Инкапсулирование липосом казеинатом натрия (КН) (Sigma) осуществляли согласно методике [5], с весовым соотношением КН:ФХ = 10:1 при концентрации ФХ в липосомах 1 мг/мл. Природный биополимер КН является натриевой формой основного белка молока, в которую входят такие индивидуальные белки, как ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины), поэтому преимущества его использования в качестве наноконтейнера для ФХ липосом заключаются, кроме защиты последних от окисления, в повышении питательной ценности таких биологических наноконтейнеров. КН растворяли в том же фосфатном буфере (рН 7,2, ионная сила 1 мМ), перемешивая смесь на магнитной мешалке, затем раствор центрифугировали от примесей. Низкая ионная сила буфера была выбрана для того, чтобы при инкапсулировании были задействованы электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами белка и липидов. Концентрацию белка в растворе определяли методом дифференциальной рефрактометрии по известному значению инкремента показателя преломления белка. Растворы КН и липосом ФХ в фосфатном буфере смешивали в шейкере (GFL 3032, Германия) в течение 1 ч при 40°C.

Для инициирования окисления липосом использовался водорастворимый азо-инициатор ААРН с конечной концентрацией в растворе липосом 2 мМ. Окисление осуществлялось в пробирках, помещенных в термостат, при температурах 37°C и 60°C, а для измерения размеров и z-потенциала липосом в процессе их окисления из пробирок отбирались пробы окисляемых липосом. Степень развития ПОЛ регистрировали во времени по УФ-спектрам поглощения ДК при  $\lambda = 233$  нм и кетодиенов (КД) при  $\lambda = 274$  нм на спектрофотометре (Perkin Elmer, Lambda-25). Ошибка измерения оптической плотности (А) составила не более 3%. Погрешность определения  $A-A_0$  по трем повторным измерениям не превышала  $\pm 10\%$ . При определении размеров липосом в растворе использовался метод ДСР - метод фотонной корреляционной спектроскопии. В этом методе проводится расчет гидродинамического диаметра сфер ( $D_h$ ), которые двигались бы в жидкости с той же скоростью, что и исследуемые частицы. Измерения  $D_h$  липосом проводились на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с  $\lambda = 633$  нм. Концентрация РС липосом составляла 1 мг/мл, температура 25°C, индекс полидисперсности (PdI) суспензий липосом для всех измерений менялся в пределах 0,1-0,3. Для каждого размера  $D_h$  осуществлялась регистрация 5-10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении, усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Так как каждый опыт по окислению повторялся 3 раза, то учитывались также ошибки для  $D_h$  при его повторных измерениях. Суммарная погрешность не превышала  $\pm 5\%$ . Для измерения z-потенциала (Z) липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц. Поскольку z-потенциал связан с ЭФП, программа прибора рассчитывает и строит распределение для z-потенциала. Для всех изученных образцов липосомных суспензий спектр подвижности содержал только одну полосу. Калибровка проводилась по стандартной дисперсии полистирольного латекса с погрешностью  $\pm 5\%$ . Усреднение максимальных значений z-потенциала осуществлялось по трем повторным измерениям при окислении, воспроизводимость для идентичных образцов различалась в разные моменты времени окисления, но была в пределах 10%. С учетом погрешности калибровки прибора, суммарная ошибка измерений z-потенциала была не более  $\pm 12\%$ .

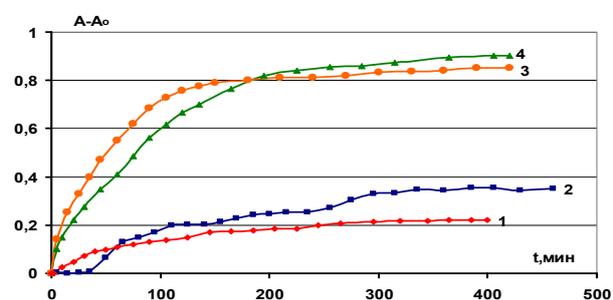
Первым этапом наших исследований было изучение процессов авто и инициированного окисления липосом из соевого ФХ в зависимости от температуры. На рисунке 1 для двух значений температур (37°C и 60°C) приведены примеры спектров поглощения липосом ФХ в различные моменты времени в процессе их инициированного окисления. При  $\lambda = 233$  нм (верхние спектры) появляются характерные максимумы поглощения для ДК, в то время, как при  $\lambda = 274$  нм для КД четко выраженных максимумов не наблюдается (нижние). За время наблюдения накопление КД составило менее 10% от образования ДК. Поэтому дальнейшее изучение окисления проводилось только по изменению концентрации ДК. На рисунке 2 представлена динамика изменения поглощения ДК липосом ФХ в процессе их авто (кривые 1, 2) и инициированного ААРН (кривые 3, 4) окисления при температурах 37°C (1, 3) и 60°C (2, 4). Видно, что автоокисление при 37°C развивается очень медленно (период индукции составляет 5 часов), и в течение всего остального времени наблюдения (до 10 часов) можно отметить лишь незначительное увеличение содержания ДК. Увеличение температуры ускоряет этот процесс, сокращая период индукции на кривой накопления ДК до 30 минут. Учитывая величину коэффициента молярной экстинкции ДК при  $\lambda = 233$  нм, равную  $274000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ , можно оценить среднюю скорость формирования ДК при автоокислении. Для  $T = 37^\circ\text{C}$  в течение 300 мин (от 300 до 600 мин) она составляет  $0,84 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{мин}^{-1}$ . С увеличением температуры до 60°C скорость автоокисления возрастает почти на порядок ( $8,14 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{мин}^{-1}$  на участке кривой 2, от 40 до 200 мин). При переходе к инициированному окислению при 37°C наблюдается немонотонный ход кривой накопления ДК, а именно, чередование ускорения и замедления окисления (кривая 3). По-видимому, это связано с наличием в соевом ФХ Lipoid S100 (фирмы Lipoid GmbH, Германия) трех основных ненасыщенных жирных кислот (ЖК): олеиновой, линолевой и линоленовой (в процентном соотношении 13 : 60 : 7 ко всем ЖК). Вероятно, они поочередно включаются в окислительный процесс в соответствии с отношением их концентраций и констант скорости окисления (1:10:15) [6]. При повышении температуры (рис. 2 кривая 4) этот эффект практически не проявляется. Исчезает и небольшой (30 мин) период индукции, который имеет место при  $T = 37^\circ\text{C}$  и обусловлен не только кинетикой развития



**Рисунок 1.** Спектры поглощения липосом ФХ (1 мг/мл) в процессе их инициированного окисления при температурах  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (слева) и  $60^{\circ}\text{C}$  (справа) для ДК ( $\lambda = 233$  нм – верхние спектры) и для КД ( $\lambda = 274$  нм – нижние спектры). Стрелками на рисунках обозначен временной интервал окисления от  $t_0 = 0$  до  $t_{\text{кон}} = 400\text{-}500$  мин



**Рисунок 2.** Накопление ДК в процессе окисления липосом ФХ (1мг/мл): кривые 1, 2 – автоокисление, 3, 4 – инициированное окисление при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (1,3) и  $60^{\circ}\text{C}$  (2, 4).  $A_0$  – оптическая плотность при  $t = 0$

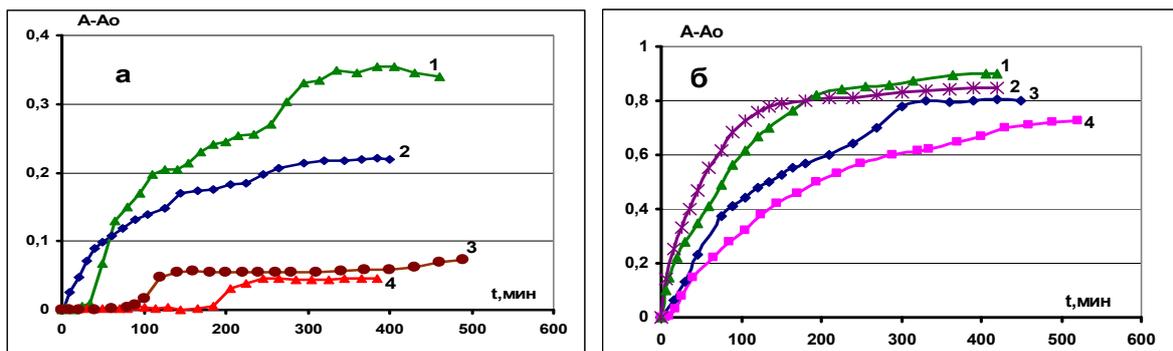


**Рисунок 3.** Влияние АЛК в составе липосом ФХ на их инициированное окисление: липосомы ФХ при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (2) и  $60^{\circ}\text{C}$  (4); липосомы ФХ с АЛК (ФХ:АЛК=1:0.59) при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (1) и  $60^{\circ}\text{C}$  (3).  $[\text{ФХ}+\text{АЛК}] = 1\text{мг/мл}$

процесса накопления ДК, но и небольшим количеством  $\alpha$ -токоферола (0,15-0,25 г/100г), которое исходно присутствует в препарате ФХ Lipoid S100. Процесс накопления продуктов окисления может замедлять и наличие в ФХ Lipoid S100 насыщенных ЖК (примерно 20%).

В дисперсном растворе липосом при постоянной скорости генерации радикалов инициатора ААРН при его термическом распаде, возникает радикально-цепное окисление ЖК в ФХ липосомах. Для ААРН скорость инициирования радикалов  $W_i = k_i [\text{ААРН}]$ , где  $k_i = 1,3 \cdot 10^{13} \cdot e^{-112600/RT}$  – константа скорости инициирования. При  $T = 37^{\circ}\text{C}$   $k_{i37} = 1,36 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ , при  $T = 60^{\circ}\text{C}$ ,  $k_{i60} = 27,6 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ , т.е. примерно в 20 раз больше. Согласно законам жидкофазного окисления углеводородов и липидов (ЛН) с квадратичным обрывом цепей, для скорости поглощения  $\text{O}_2$  справедливо:  $W_{\text{O}_2} = k_p / (2k_t)^{0,5} \times [\text{ЛН}] \times W_i^{0,5}$ , где  $k_p$  и  $k_t$  – эффективные константы скорости продолжения и обрыва цепей окисления [7]. При сравнении кривых 3 и 4 на рисунке 2 видно, что при повышении температуры накопление ДК до постоянного уровня увеличилось примерно в 3 раза. Средняя скорость окисления липосом увеличилась в течение первых 20-30 мин от начала окисления (накопления ДК) в 4,5-5,0 раза (от  $0,33 \cdot 10^{-5}$  М/мин до  $1,61 \cdot 10^{-5}$  М/мин). Главным образом, это происходит за счет значительного увеличения скорости ( $W_i$ ) термической диссоциации ААРН и наработки инициирующих окисление радикалов. Допуская, что скорость накопления ДК соответствует скорости поглощения кислорода  $W_{\text{O}_2}$ , можно оценить влияние температуры на скорость окисления ФХ в липосомах и сравнить с измеренными значениями. При одинаковом значении  $[\text{ААРН}]$ , отношение скоростей инициирования при изученных температурах  $W_{i60}/W_{i37} = k_{i60}/k_{i37} = 20$ . Используя выражение для  $W_{\text{O}_2}$  и учитывая равенство  $[\text{ЛН}]$ ,  $k_p$  и  $k_t$ , можно получить  $W_{\text{O}_2}(60^{\circ}\text{C}) / W_{\text{O}_2}(37^{\circ}\text{C}) = (W_{i60}/W_{i37})^{0,5} = (20)^{0,5} \approx 4,5$ , что примерно соответствует полученному соотношению скоростей накопления ДК [8].

Как указывалось выше, липосомы ФХ могут быть использованы в качестве носителя для доставки в организм незаменимых  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ПНЖК. В связи с этим необходимо выяснить, каково влияние ПНЖК на кинетику окисления этих липосом. С этой целью мы использовали в своих экспериментах ФХ липосомы с встроенной в них  $\omega$ -3 АЛК. На рисунке 3 приведена кинетика окисления липосом с добавлением в них АЛК при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (кривая 1) и  $60^{\circ}\text{C}$  (3). Видно, что АЛК ускоряет окисление липосом на начальной стадии процесса (до 60 мин), не имея при этом периода индукции. При  $T = 60^{\circ}\text{C}$  введение АЛК в липосомы значительно (в 1,5-2 раза) ускоряет окисление липосом примерно до 200 мин, затем кривые накопления ДК практически совпадают, что можно объяснить, по-видимому, полным расходом АЛК, введённой в липосомы.



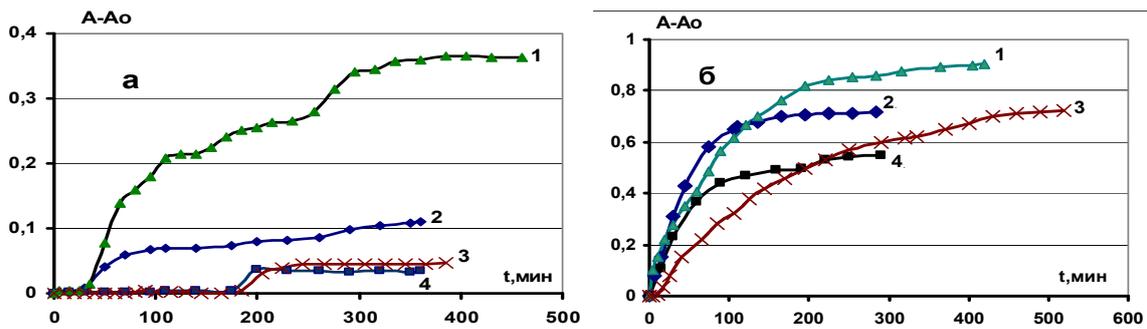
**Рисунок 4.** Ингибирование окисления липосом ФХ и ФХ+АЛК гвоздичным маслом (4%) при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  (а) и  $T = 60^{\circ}\text{C}$  (б). Липосомы ФХ (кривые 1 на обоих рис.), ФХ+АЛК (кривые 2), ФХ+ЭМГ (кривые 4) и ФХ+АЛК+ЭМГ (кривые 3). Концентрация всех смесей 1 мг/мл

Липосомы ФХ – удобная биологическая модель для изучения антиокислительной активности природных соединений, особенно если они имеют жирорастворимую природу. К таким соединениям относятся фенольные соединения ЭМГ, которое проявляет антирадикальную активность в модельной системе с дифенилпикрилгидразином (ДФПГ), в реакции с гидроксильными радикалами действует как хелатор железа, ингибирует окисление линолевой кислоты [9]. Поэтому целесообразно было проверить его АО действие в инициированном окислении ФХ липосом. В состав ЭМГ входят по массе: эвгенол (от 70 до 85%), ацетат эвгенола (13%), кариофиллен (10%), эвгенил ацетат (5%),  $\alpha$ -бергамотен (3%), цинеон (3%), линалоол, терпены и др. соединения, содержание которых менее 1%. Эвгенол (4-аллил-2-метоксифенол) – очень активный монофенольный антиоксидант, который определяет, главным образом, ингибирование окисления ПНЖК в ФХ липосомах [8]. Вместе с эвгенолом в ЭМГ присутствуют ненасыщенные алифатические и циклические соединения, многие из которых являются конкурентами за радикалы с ПНЖК, поэтому эффективность ЭМГ всегда выше, чем индивидуальных АО. В связи с этим можно отметить, что в нашем эксперименте при окислении липосом с ЭМГ (4% вес/вес) при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 180 мин происходит полное торможение окисления ФХ эфирным маслом гвоздики, а при максимальном накопления ДК, ЭМГ снижает их концентрацию примерно в 8 раз (на 87,5%) (рис. 4а, кривые 1 и 4).

Синергетический эффект компонентов ЭМГ и пролонгированное торможение окисления важны при хранении пищевых продуктов, а также с точки зрения сохранения их антиоксидантных свойств в процессе приготовления пищи с данными пищевыми добавками. Для оценки степени сохранности антиоксидантных свойств ЭМГ при повышении температуры мы провели эксперименты по окислению липосом с ЭМГ (4% вес/вес) при  $T = 60^{\circ}\text{C}$ . Повышение температуры уменьшает время полного ингибирования окисления ЭМГ примерно в 18 раз (с 180 до 10 мин.) (рис. 4б кривые 1, 4), а степень снижения концентрации ДК по сравнению с контролем на протяжении всего времени окисления составила в среднем 1,5 раза (на 37,5%). Несмотря на жёсткие условия окисления, антиоксидантные свойства ЭМГ сохраняются. Эффективность ингибирования окисления ЭМГ смеси ФХ+АЛК (рис. 4а, кривые 2, 3) несколько изменяется: при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  ЭМГ только в 4 раза (на 73%) снижает накопление ДК и в 2 раза уменьшает период индукции, вероятно, за счет очень активного окисления АЛК. При повышении температуры (рис. 4б) период индукции практически исчезает, а концентрация ДК в течение ингибирования ЭМГ уменьшается неравномерно (от 30 до 5%). Возможно, что понижение ингибирующей способности ЭМГ при такой температуре связано с разложением некоторых его компонентов, включая эвгенол, и потерей им антиоксидантной активности.

Как уже упоминалось, одним из способов предохранения липосом ФХ от окисления является инкапсулирование их различными гидрофильными биополимерами, которые способствуют повышению растворимости липосом ФХ в водной среде, а также сохраняют их функциональность. В нашей работе был использован природный биополимер казеинат натрия (КН) [10]. Он является натриевой формой основного белка молока, объединяющей такие индивидуальные белки, как казеины ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -). Поэтому преимущества его использования для липосом ФХ заключаются не только в защите их от окисления, но и в повышении питательной ценности таких биологических наноконтейнеров. Для исследования влияния КН на окисление ФХ липосом, была изучена кинетика ингибирования им окисления при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  и  $60^{\circ}\text{C}$  и с его одновременным действием вместе с ЭМГ (рис. 5).

При  $T = 37^{\circ}\text{C}$  КН снижает максимальный уровень ДК примерно в 3.5 раза (на 70%) (рис. 5а, кривые 1, 2), а вместе с ЭМГ – в 10 раз (на 90%). При этом КН мало меняет периоды индукции окисления ФХ (кривые 1, 2) и ФХ+ЭМГ (кривые 3, 4). На основании данных о структурных параметрах комплексных частиц [11], сделан вывод, что комплексы КН с изученными липосомами ФХ представляют собой супрамолекулярные частицы с плотной структурой. Формирование такого комплекса, вероятно, препятствует диффузии кислорода к ненасыщенным углеродным связям ЖК в липосомах, и тем самым способствует их защите от окисления. С увеличением температуры ингибирующее действие КН значительно уменьшается, а периоды индукции практически исчезают

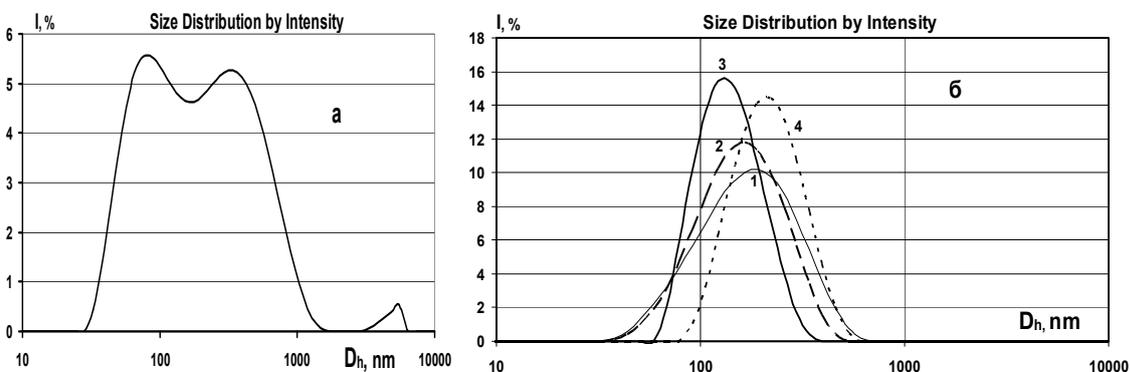


**Рисунок 5.** Ингибирующее действие инкапсулирования ФХ липосом КН (кривые 2 на обоих рисунках) и совместным действием его с ЭМГ (кривые 4) при  $T=37^{\circ}\text{C}$  (а) и  $T=60^{\circ}\text{C}$  (б). Липосомы ФХ (кривые 1) и ФХ+ЭМГ (кривые 3). [ФХ+ЭМГ]=1 мг/мл, КН:ФХ:ЭМГ=10:1:0,04.

(рис. 5б, кривые 2, 4). Включение липосом в КН приводит к снижению максимального уровня ДК лишь в 1,3 раза (на 20%), а совместное использование КН с ЭМГ увеличивает этот эффект до 1,7 раза (на 40%). Снижение ингибирующего действия КН при нагревании связано, возможно, со структурными изменениями комплексов и значительной потерей ими защитных функций по отношению к окислению ФХ.

Как уже упоминалось во введении, ПНЖК фосфолипидов мембран подвергаются значительной модификации в процессе ПОЛ, что приводит к деградации липидных ацильных цепей фосфолипидов. Меняются физико-химические свойства мембран: текучесть, проницаемость, активность протеинов и др. и их важные функции, что приводит к старению клеток и появлению различных заболеваний [12]. На кинетику ПОЛ в липосомах существенно влияет структура ее липидных компонентов и их способность к созданию агрегатов, что может приводить к изменению размеров и z-потенциала (поверхностного заряда) липосом в процессе ПОЛ [13]. В свою очередь изменения заряда липосом могут влиять на кинетические характеристики их окисления [14, 15]. В настоящей работе были измерены размеры и z-потенциал липосом ФХ в процессе их инициированного окисления при  $T = 37^{\circ}\text{C}$  с целью установления взаимосвязи этих параметров с изменениями концентрации продуктов ПОЛ (ДК). Было исследовано также влияние на динамику изменения размеров и z-потенциала при окислении добавления в липосомы АЛК, введения в них ЭМГ и инкапсулирования их КН.

Результаты наших экспериментов показали, что при температуре  $60^{\circ}\text{C}$ , когда при окислении липосом ФХ уровень ДК увеличился в 3 раза к концу наблюдения по сравнению с уровнем ДК при  $37^{\circ}\text{C}$  (рис. 2, кривые 2 и 4), средний размер липосом немонотонно повышался и достиг величины  $(260 \pm 60)$  нм, что примерно в 1,7 раза выше исходного. Это может говорить об образовании в процессе окисления при таких условиях, кроме ДК, множества липидных конгломератов различных размеров. На рис. 6а приведена иллюстрация распределения интенсивности светорассеяния окисленных липосом ФХ при  $60^{\circ}\text{C}$  к концу окисления ( $t = 360$  мин.). Видно, что в суспензии липосом образуются частицы с очень большим разбросом размеров, а ошибка измерения среднего размера составляет свыше 20%. Поэтому дальнейшее изучение динамики изменения размеров и z-потенциала мы проводили только при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . На рисунке 6б показаны типичные кривые распределения интенсивности по размерам липосом из ФХ+АЛК в разные моменты времени окисления при  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , откуда видно, что все кривые имеют один максимум. В таблице 1 приведены размеры и z-потенциал липосом с различным составом, измеренные до их окисления, и индекс полидисперсности. Видно, что введение в липосомы



**Рисунок 6.** а – распределение интенсивности (I) светорассеяния окисленных липосом ФХ при  $T = 60^{\circ}\text{C}$  к концу окисления ( $t = 360$  мин.); б - распределения интенсивности светорассеяния по размерам липосом ( $D_h$ ) для смеси ФХ+АЛК в процессе инициированного окисления при  $T = 37^{\circ}\text{C}$ : 1 – без ААРН, 2 – с добавлением ААРН при  $t = 0$  мин, 3 –  $t = 30$  мин,  $t = 360$  мин

**Таблица 1.** Гидродинамический диаметр ( $D_h$ ) и z-потенциал ( $Z$ ) липосом до окисления (перед введением инициатора ААРН). Индекс полидисперсности (PDI)

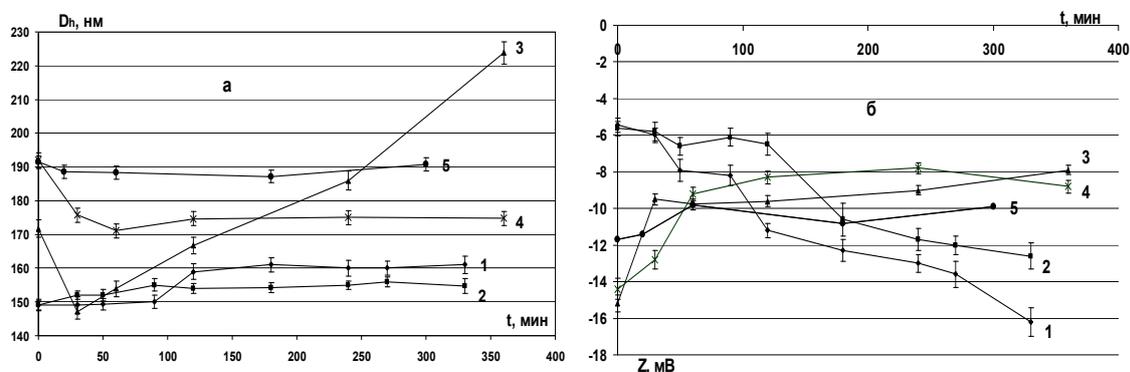
Состав липосом	$D_h$ , нм	z-потенциал ( $Z$ ), мВ	PDI
ФХ	150,7±4,9	-23,1±2,2	0,227±0,012
ФХ+ЭМГ	153,2±1,8	-14,8±1,4	0,247±0,009
ФХ+АЛК	187,2±4,2	-38,6±3,5	0,197±0,005
ФХ+АЛК+ЭМГ	201,3±3,6	-32,8±3,2	0,201±0,009
ФХ+КН	204,4±6,3	-15,4±0,8	0,270±0,014

добавок и их инкапсулирование КН меняет  $D_h$  липосом и их заряд. Для ЭМГ, вероятно, молекулы липофильного эвгенола и других компонентов встраиваются в липидные слои фосфолипидов, нарушая их регулярную упаковку, что может приводить к небольшому увеличению  $D_h$ .

При внедрении в липосомы молекул АЛК, карбоксильные группы которых заряжены отрицательно и обращены к водной фазе, существенно увеличивается абсолютная величина z-потенциала (поверхностный отрицательный заряд) липосом и их средний размер. Добавление в (ФХ+АЛК) липосомы ЭМГ приводит к небольшому увеличению их размера и к уменьшению абсолютного значения  $Z$ . При капсулировании ФХ-липосом КН происходит естественное увеличение размера полученной капсулы, при этом абсолютное значение отрицательного z-потенциала уменьшается по сравнению с z-потенциалом ФХ липосом, по-видимому, за счет компенсации отрицательного заряда ближайшими к липосоме положительно заряженными группами белковой оболочки. На рисунке 7 приведена динамика изменения средних размеров ( $D_h$ ) (а) и z-потенциала ( $Z$ ) (б) ФХ-липосом (кривые 1), наполненных (2-4) и инкапсулированных (5) в процессе их инициированного окисления. После введения инициатора ААРН в дисперсию липосом (при  $t = 0$ ), их  $D_h$  и z-потенциал меняются. Т.к. молекулы ААРН (RN=NR) заряжены положительно, то попадая в липосомы, они частично нейтрализуют отрицательный заряд поверхностных структур фосфолипидов, поэтому абсолютная величина отрицательного z-потенциала всех изученных липосом в начале окисления (рис. 7б,  $t = 0$ ) уменьшается по сравнению с z-потенциалом до введения ААРН. Вследствие этого, вероятно, происходит перестройка фосфолипидов в бислое, и размер липосом уменьшается (рис. 7а,  $t = 0$ ). Особенно это выражено у липосом ФХ+АЛК (кривые 3, 4,  $t = 0$ ).

При термораспаде азоинициатора, генерации свободных радикалов ( $R^*$ ) и быстрого образования пероксильных радикалов  $ROO^*$  инициатора, происходит окисление ПНЖК в липосомах, их частичная трансформация из *cis* в *trans-cis* и *trans-trans* изомерные первичные продукты окисления гидропероксида (ДК). Эти трансформации в конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов приводят к важным изменениям в структуре липосомальной мембраны, и, как следствию, в размерах и z-потенциале липосом. Для ФХ липосом (кривая 1)  $D_h$  увеличивается примерно на 6-7% через 100-120 минут от начала окисления. К этому времени  $Z$  возрастает по абсолютной величине с -5 до -12 мВ и продолжает расти до конца окисления до -16 мВ. Ход кривой 1 на рисунке 7б напоминает зеркальное отображение хода кривой 3 на рисунке 2, т.е. изменение z-потенциала коррелирует с изменением содержания ДК. Т.к. сродство фосфолипидных молекул между собой в бислое липосом меняется в процессе окисления, меняется ориентация полярных головок фосфолипидов [3].

Происходит перегиб окисленных ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов и приближение их ООН-групп к поверхности липосомы [16]. Протекающие структурные изменения могут способствовать диссоциации этих групп, что является основной причиной увеличения отрицательного заряда на поверхности липосом. При этом при таких концентрациях ДК общий объем трансформированных окисленных фосфолипидов увеличивается недостаточно. Это свидетельствует о том, что при физиологической температуре в процессе окисления размеры липосом меняются незначительно, и зависимости (корреляции) размера от концентрации ДК не наблюдается.



**Рисунок 7.** Динамика изменения среднего гидродинамического диаметра  $D_h$  (а) и z-потенциала  $Z$  (б) в процессе инициированного окисления: 1 – ФХ-липосом, 2 – с ЭМГ (ФХ:ЭМГ = 1:0,04), 3 – с АЛК (ФХ:АЛК = 1:0,59), 4 – с АЛК+ЭМГ (ФХ:АЛК:ЭМГ=1:0,59:0,04), 5 – с КН (ФХ:КН = 1:10).  $[ФХ] = [ФХ+ЭМГ] = [ФХ+АЛК] = [ФХ+АЛК+ЭМГ] = 1$  мг/мл,  $[ААРН] = 2$  мМ,  $T = 37^{\circ}C$ .

Присутствие в ФХ-липосомах ЭМГ (кривая 2) несколько замедляет рост абсолютной величины отрицательного поверхностного заряда липосом примерно до 120 минут, после чего он возрастает, не достигая, однако, заряда исходных липосом. Размер липосом в течение всего времени окисления в этом случае «стабилизируется» и практически не меняется. Для липосом ФХ+АЛК в течение первых 30-40 минут размер липосом снижается с 170 до 150 нм, а абсолютная величина z-потенциала падает от -15 до -10 мВ (кривые 3 на рис. 7). Это время совпадает с полным окислением АЛК (кривая 2, рис 4), а далее продолжается окисление ПНЖК в оставшемся ФХ. В процессе дальнейшего окисления липосом происходит значительное (до 220 нм) увеличение их размера, вероятно, не только из-за постепенного накопления ДК, но и за счет образования больших образований ДК с остатками окисленных АЛК. Поверхностный заряд и z-потенциал остаются практически на одном уровне (около -10 мВ). Присутствие в (ФХ+АЛК) липосомах ЭМГ значительно ингибирует окисление АЛК в течение 100 мин. (кривая 3, рис.4), и разброс изменения  $D_h$  и z-потенциала существенно сглаживается – эти параметры остаются практически неизменными в процессе дальнейшего окисления липосом (кривые 4 на рис. 7). Как было отмечено ранее, при окислении липосом и наработки гидроперекисей в гидрофобных хвостах жирных кислот ФХ появляются гидрофильные перекисные группы, которые влияют на перестройку структуры бислоя. В работе [17] методом малоуглового рентгеновского рассеяния проведена оценка изменения толщины и структуры бислоя больших одноламеллярных везикул и места локализации гидропероксидных и карбоксильных групп при различных соотношениях в бислое неокисленных фосфолипидов POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и двух видов окисленных: POPC-ООН и Paze-PC (1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocoline). Было установлено, что 95% гидроперекисных групп находятся в полярной области мембраны вблизи карбонильных групп практически для всех соотношений фосфолипидов. Средняя молекулярная площадь постепенно увеличивается от  $65 \text{ \AA}^2$  для POPC-бислоев до  $78 \text{ \AA}^2$  для бислоев POPC-ООН, в то время как толщина окисленной мембраны становится тоньше не окисленной. В нашей работе, при окислении смеси ФХ+АЛК со сложным составом ФХ возможно образование различных, меняющихся во времени, агрегатных частиц из смеси окисленных и не окисленных ФХ, остатков АЛК и промежуточных субстанций, что приводит к увеличению среднего размера липосом, уменьшению и стабилизации абсолютной величины отрицательного z-потенциала.

При инкапсулировании исходных ФХ-липосом в КН, за счет эффективного ингибирования окисления белковой оболочкой (кривая 2, рис. 5) размер липосом практически остается на начальном уровне (190 нм) в течение всего процесса окисления, несмотря на накопление некоторого количества ДК. Величина отрицательного заряда «капсулы» немного уменьшается в начале окисления, а далее z-потенциал остается на уровне -10 мВ до конца окисления (рис. 7б, кривая 5). Т.о., белковая оболочка не только заметно предохраняет ПНЖК фосфолипидов липосом от окисления, но и стабилизирует размер и z-потенциал этой липосомно-белковой структуры. В [18] методом калориметрии смешения был установлен преобладающий вклад электростатического взаимодействия между КН и ФХ-липосомами в формировании комплексных частиц в нейтральной области рН. На основании таких данных о структурных параметрах комплексных частиц как: молярная масса, размер, форма и плотность частиц, измеренных методом ДСР, был сделан вывод, что эти комплексы представляют собой супрамолекулярные частицы с плотной структурой. Это, по-видимому, препятствует диффузии кислорода к ненасыщенным углеродным связям ПНЖК в липосомах, и способствует снижению их окисления, что приводит к стабилизации размеров и z-потенциала комплексов в процессе окисления. В работе [16] с помощью флуоресцентной микроскопии гигантских одноламеллярных везикул, дающих возможность непосредственной визуализации действия гидропероксидов на структуру липидов мембран, исследовали роль различных форм окисленных фосфолипидов на образование микродоменных рафтов при тщательном контроле состава мембран. При окислении липосом в гидрофобных хвостах жирных кислот ФХ появляются гидрофильные перекисные группы, которые переориентируются в пространстве, что приводит к конформационным преобразованиям в фосфолипидах и увеличению их молекулярного объема и, как следствие, к изменению размера и заряда липосом. В этой работе приведены схематические наглядные иллюстрации изменения формы и занимаемого объема для POPC и двух его окисленных видов: POPCOОН и PazePC. В работе приводится также рисунок предполагаемой модели изменения структуры бислоя мембраны в процессе окисления, которая может прояснить сложные процессы, протекающие в биомембранах *in vivo*.

Таким образом, в настоящей работе показано, что инициированное ААРН окисление липосом из соевого ФХ при физиологической температуре ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) можно эффективно (на 80-90%) ингибировать фенольными соединениями ЭМГ. При повышении температуры до  $60^\circ\text{C}$  значительно увеличивается скорость окисления, и ингибирование образования продуктов окисления липосом существенно уменьшается. Добавление в ФХ липосомы  $\omega$ -3 АЛК приводит к заметному ускорению окисления, и этот эффект усиливается с ростом температуры. Использование инкапсулирования липосом КН снижает окисление липосом на 70%, а совместное действие его с ЭМГ – на 90%. Изучение динамики изменения размеров и z-потенциала липосом в процессе окисления при физиологической температуре показало, что размер ФХ-липосом увеличивается на 6-7% и не коррелирует с изменением уровня ДК, а абсолютная величина отрицательного z-потенциала увеличивается к концу окисления примерно в 3 раза. Введение в липосомы АЛК увеличивает средний диаметр липосом на 30% к концу окисления, а значения отрицательного z-потенциала уменьшаются. Наличие в липосомах ЭМГ меняет эти закономерности и стабилизирует размеры и z-потенциал и для ФХ-липосом, и для липосом с АЛК. Комплекс ФХ-липосом с КН существенно снижает накопление ДК в процессе окисления и приводит к стабилизации его размеров и z-потенциала. Можно сделать вывод, что изменения z-потенциала и размеров при окислении липосом зависят, главным образом, от перестройки в конфигурации жирнокислотных цепей фосфолипидов и от

перегруппировки их полярных головок. Ингибирующие окисление агенты стабилизируют изменения этих параметров в процессе окисления

#### Список литературы / References:

1. Донелли Д., Ренсли Д., Рид Н. *Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний*. Т. New York: Acad. Press, 1986, 509 p. [Donelli D., Rensly D., Rid N. Food and nutritional supplements. A dietary supplement role in prevention of diseases (in Russ.). T. New York: Acad. Press, 1986, 509 p.]
2. McClements D.J. *Nanoparticle – and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds*. New York: CRC Press Taylor and Francis Group, 2014, 30 p.
3. Mosca M., Cerlie A., Ambrosone L. Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, 2011, vol. 164, pp. 158-165. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2010.12.006.
4. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. Ингибирование окисления метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот эфирными маслами. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016, т. 52, с. 1-76. DOI: 10.7868/S0555109916030120. [Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorob'eva A.K., Terenina M.B., Krikunova N.I. Inibirovanie okisleniya metilovyh efirov nenasyshchennyh zhirnyh kislot efirnymi maslami. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2016, vol. 52, pp. 1-76. (In Russ.)]
5. Semenova M.G., Antipova A.S., Misharina T.A., Alinkina E.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Palmina N.P., Binyukov V.I., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Ozerova N.S., Shumilina E.A., Baeva K.A., Bogdanova N.G. *Gums and Stabilisers for the Food Industry 18: Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions*. Cambridge. Publ.: Royal Soc. of Chem., 2016, 182 p.
6. Строев Е.А. *Биологическая химия*. М.: Высш. школа, 1986, 479 с. [Stroev E.A. *Biological Chemistry*. M. Vjsshaja shkola, 1986, 479 p. (in Russ.)]
7. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. Boca Raton: CRC Press., 2005, 350 p.
8. Sazhina N.N., Antipova A.S., Semenova M.G., Palmina N.P. Initiated Oxidation of Phosphatidylcholine Liposomes with Some Functional Nutraceuticals. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2019, vol. 45, no. 1, p. 34. DOI: 10.1134/S1068162019010138
9. Jirovetz L., Buchbauer L., Stoilova L., Stoyanova A., Krastanov A., Schmidt A. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2006, vol. 54, p. 6303. DOI: 10.1021/jf060608c
10. Semenova M.G. Advances in molecular design of biopolymer-based deliverymicro/nanovehicles for essential fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 2017, vol. 68, p. 114.
11. Semenova M.G., Antipova A.S., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anokhina M.S., Grigorovich N.V., Moiseenko D.V. Structural and thermodynamic properties underlying the novel functionality of sodium caseinate as delivery nanovehicle for biologically active lipids. *Food Hydrocolloids*, 2014, vol. 42, p. 149. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.028.
12. Perluigi M., Coccia R., Butterfield D.A. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Reactive Product of LipidPeroxidation, and Neurodegenerative Diseases:A Toxic Combination Illuminated by Redox Proteomics Studies. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2012, vol. 17, no. 11. DOI: 10.1089/ars.2011.4406
13. Soto-Arriaza M.A., Sotomayor C.P., Lissi E.A. Relationship between lipid peroxidation and rigidity in L-alpha-phosphatidylcholine-DPPC vesicles. *Journal Colloid and Interface Science*, 2008, vol. 323, p. 79. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.04.034.
14. Pinchuk I., Lichtenberg D. Analysis of the kinetics of lipid peroxidation in terms of characteristic time-points. *Chem. Phys. Lipids*, 2014, vol. 178, p. 63. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.12.001
15. Gal S., Pinchuk I., Lichtenberg D. Peroxidation of liposomal palmitoyllinoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effects of surface charge on the oxidizability and on the potency of antioxidants. *Chem. Phys. Lipids*, 2003, vol. 126, p. 95. DOI: 10.1016/S0009-3084(03)00096-3
16. Tsubone T.M., Junqueira H.C., Baptista M.S., Itri R. Contrasting roles of oxidized lipids in modulating membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta – Biomembranes*, 2019, vol. 1861, p. 660. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.12.017
17. De Rosa R., Spinuzzi F., Itri R. Hydroperoxide and carboxyl groups preferential location in oxidized biomembranes experimentally determined by small angle X-ray scattering: Implications in membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 2018, vol. 1860, p. 2299. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.05.011.
18. Istarova T.A., Semenova M.G., Sorokoumova G.M., Selishcheva A.A., Belyakova L.E., Polikarpov Yu.N., Anikhina M.S. Effect of pH on the interactions of sodium caseinate with soy phospholipids in relation to the foaming ability of their mixtures. *Food Hydrocolloids*, 2005, vol. 19, pp. 429. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2004.10.009.

**THE INITIATED OXIDATION OF PHOSPHATIDYLCHOLINE LIPOSOMS AND CHANGE OF THEIR PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS IN THE COURSE OF OXIDATION****Sazhina N.N., Palmina N.P., Plashchina I.G., Antipova A.S., Semenova M.G.**

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

*Kosygina str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: Natnik48s@yandex.ru*

**Abstract.** In the present work the kinetics of initiated by a water-soluble azo-initiator AAPH oxidation of liposomes from soy phosphatidylcholine (PC) at different temperatures and with addition in them of the alpha-linolenic acid (ALA) and also inhibition of liposome oxidation by essential oil of clove buds (EOC) and liposome encapsulation in sodium caseinate (SC) is studied. Dynamics of change of liposome sizes and z-potential in the course of their oxidation is registered by the method of dynamic light scattering. Results of work showed that the liposome oxidation initiated by AAPH from soy PC at  $T = 37^{\circ}\text{C}$  is inhibited effectively (80-90%) by EOC phenolic connections. At temperature increase to  $60^{\circ}\text{C}$  the speed of liposome oxidation increases by 4-5 times, and the inhibition of formation of oxidation products significantly decreases. Addition in PC liposomes of ALA leads to acceleration of oxidation in comparison with PC liposomes. Encapsulation of liposomes by SC reduces liposome oxidation by 70%, and its joint action with EOC – by 90%. With temperature increase decreases the efficiency of protective function of SC cover. In the course of oxidation at  $T = 37^{\circ}\text{C}$  the size of PC-liposomes increases by 6-7%, and the absolute value of negative z-potential increases in oxidation end approximately by 3 times. Introduction to liposomes of ALA considerably affects dynamics of change of their sizes and z-potential. Presence of EOC in liposomes stabilizes their sizes and z-potential in the course of oxidation both for PC liposomes, and for liposomes with ALA. The complex of PC-liposomes with SC also leads to stabilization of its sizes and z-potential.

**Key words:** *liposomes, lipid peroxidation, phosphatidylcholine, essential oil of clove, sodium casein, alpha-linolenic acid.*