

**ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА С ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ И КАРНОЗИНОМ:
ПОЛУЧЕНИЕ, АНТИАГРЕГАНТНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ**
Щелконогов В.А.^{1,2,3}, Баранова О.А.², Чеканов А.В.², Казаринов К.Д.³, Шастина Н.С.¹,
Стволинский С.Л.⁴, Федорова Т.Н.⁴, Соловьева Э.Ю.², Федин А.И.², **Сорокоумова Г.М.¹**

¹ МИРЭА – Российский технологический университет

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

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Минздрава Российской Федерации

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

³ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН

пл. Введенского, 1, г. Фрязино Московской области, 141190, РФ

⁴ Научный центр неврологии

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

Поступила в редакцию 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0519

Аннотация. Были подобраны оптимальные условия для получения липосомальной формы, с липоевой кислотой (ЛК) и карнозином. Методом активной и пассивной загрузки удалось добиться высокой эффективности включения карнозина ($60\pm 5\%$) и липоевой кислоты ($\text{ЭВ}=75\pm 5\%$) в наночастицы (НЧ). Было показано, что добавление сахарозы или холестерина (ХС) к нанодисперсиями (НД) приводило к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы ($45\pm 5\%$). Получение ФХ-липосом (ФХ-Лс) с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному уменьшению степени включения карнозина (16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась ($\text{ЭВ}=58-69\%$). Было установлено, что полученные нанодисперсии представляют гомогенную систему наночастиц с размером 175-250 нм. Методом просвечивающей электронной микроскопии было обнаружено, что Лс ЛК+Карн представляют однородную систему, состоящую в основном из сферических наночастиц размером 120-200 нм. Важно отметить, что полученные липосомы с ЛК и карнозином стабильны в течение длительного хранения (15 мес.) при + 4 °С и комнатной температуре. Установлено, что ЛК с Карн проявляют антиоксидантное действие, приводя к 15-кратному снижению концентрации продуктов перекисидации липидов. Показано влияние полученных липосомальных препаратов на агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленной арахидоновой кислотой (АК). Установлено, что липосомы с ЛК и карнозином снижают степень агрегации Тц на 60-70%, относительно контролей.

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

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

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.

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

Другим эффективным антиоксидантом является карнозин (Карн.). Карнозин (β - аланил-L-гистидин), - 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 эксайтотоксичность 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 карнозинызы.

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 липосомальной формы, содержащей одновременно липоевую кислоту и карнозин. Известно, что липосомы способны проникать через гематоэнцефалический барьер и через различные мембраны клеток (посредством их слияния с клеточной мембраной или рецептор-опосредованного эндоцитоза).

Целью данной работы является получение липосомальной формы, содержащей карнозин и липоевую кислоту, и исследование её антиоксидантных и антиагрегационных свойств в отношении тромбоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 94% чистоты, выделенный из бобов сои («LipoidGmbH», Германия); Липоевую 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 липоевую кислоту с карнозином. Смесь ФХ (40 мг) и ЛК (5 мг) растворяли в 2 мл хлороформа, затем реакционную смесь упаривали, растворяли в сульфате аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,3 M) 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 25 мг/мл, при нагревании при температуре 50 °C и перемешивали в течении 30 минут. Степень включения субстанций в липосомах определяли спектрофотометрическим методом.

Определение ТБК-активных продуктов. Использовали свежеприготовленный реагент, который получали следующим образом: 30 г трихлоруксусной кислоты и 0,134 г тиобарбитуровой кислоты (ТБК) растворяли в 200 мл дистиллированной воды при нагревании на водяной бане. К 0,5 мл 1% (m/v) водной дисперсии анализируемого образца добавляли 3 мл указанного выше реагента и кипятили в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл хлороформа, при этом липиды переходили в нижнюю хлороформную фазу. Измеряли оптическую плотность раствора в верхней водной фазе относительно реагента при 580 и 532 нм и рассчитывали концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в образце по формуле:

$$C_{ТБК-АП} = \frac{(OD_{532} - OD_{580}) \times 6 \times 1000}{155}, \text{ (нмоль/мл)},$$

коэффициент экстинкции МДА при 532 нм – 155 мМ⁻¹×см⁻¹;
коэффициент разведения липосом в реакционной среде – 6.

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 135 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 (225 мкл), добавляли липосомы без антиоксидантов, или липосомальный препарат с ЛК и карнозином, или липосомы с ЛК, или с карнозином, или их водорастворимые формы (20-30 мкл), инкубировали в течение 5 мин при 37 °С. Затем добавляли индуктор агрегации Тц арахидоновую кислоту (25 мкл, 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.

В ходе работы подбирали оптимальные условия для максимально возможного включения ЛК и Карн 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+ХС, и ФХ с сахарозой с размером НЧ равным 150-250 нм. Значения индекса полидисперсности (PDI) полученных липосом были меньше 0,3, что подтверждало однородность данных нанодисперсий. Необходимо отметить, что размеры и PDI 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 (ЭВ = 16%) в липосомы. При этом получение липосом, содержащих ЛК и Карн. одновременно активной загрузкой привело к значительному увеличению эффективности включения карнозина в липосомы (63±5%). Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению степени включения карнозина в наночастицы (35-45%). Тем временем эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов пассивной и активной загрузки практически не изменилась (58-75%). Полученные нанодисперсии были электронейтральными. Необходимо отметить, что липосомы, содержащие ЛК и Карн., были стабильными при длительном хранении (12 мес.) при комнатной температуре (рис. 1), по-видимому, за счет стабилизации липидного бислоя ЛК или карнозином. Данные вещества могут выступать в роли со-ПАВА в наночастицах.

Таблица 1. Характеристики липосом, содержащих одновременно липоевую кислоту с карнозином, рН 7,4, ионная сила 0,15 мМ

Состав липосом, 40мг/мл	Лекарственное вещество		ζ-потенциал, мВ	ЭВ, %		PDI	Размер частиц, нм
	ЛК Сисх., мг/мл	Карнозин Сисх., мг/мл		ЛК	Карнозин		
пассивная загрузка							
ФХ	5	25	5,5±2,5	57±10	18±5	0,154±0,010	220±20
активная загрузка							
ФХ	5	25	3,0±1,5	75±5	63±5	0,153±0,017	230±10
ФХ+ХС	5	25	7,5±3,5	68±5	35±10	0,184±0,052	245±10
ФХ+сахароза	5	25	5,0±2,5	58±10	45±7	0,081±0,023	150±15

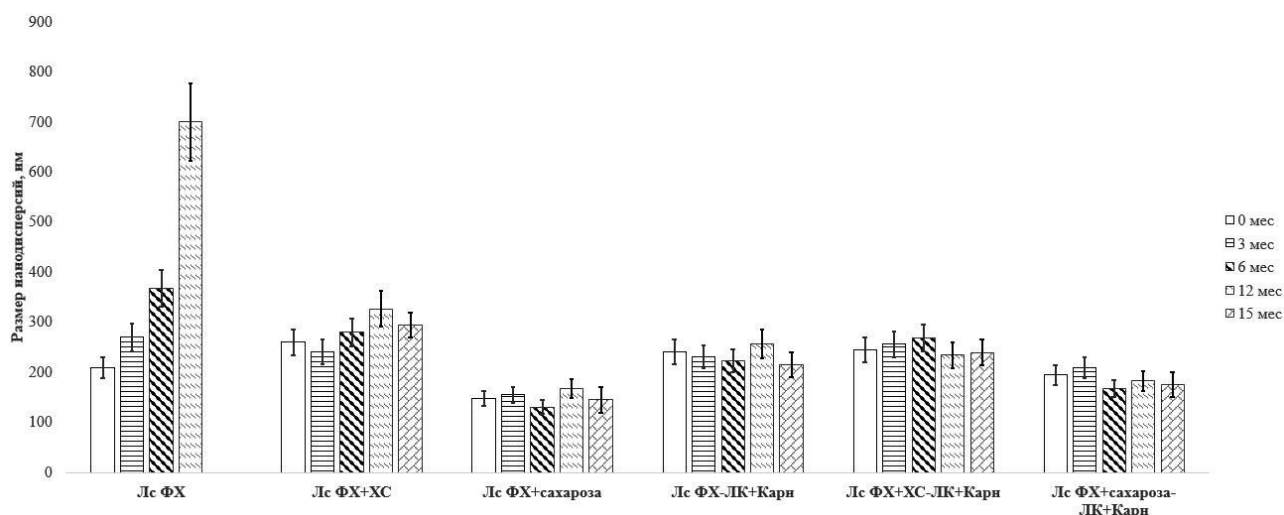


Рисунок 1. Размер липосом, содержащих ЛК и Карн, в течение длительного хранения при комнатной температуре. (Сфх=40 мг/мл, Схол=4 мг/мл, Слк=5 мг/мл, Скарн=25 мг/мл)

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 Лс, без антиоксидантов, также имеют сферическую форму, но образуют небольшие агрегаты, гетерогенные системы (рис. 2, А).

Для исследования антиоксидантного действия полученных липосомальных препаратов с ЛК и Карн на следующем этапе работы на модели реакции Фентона изучалось их влияние на окисление липидов в присутствии индуктора окисления Fe^{2+} и H_2O_2 . К образцам ФХ Лс содержащим Карн или ЛК, в различных концентрациях (Скарн = 10^{-4} М – 10^{-2} М, Слк = 5×10^{-3} М) добавляли компоненты реакции Фентона: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (С= 10^{-4} М) и H_2O_2 (С= 10^{-3} М), затем инкубировали при различных температурах (37 или 100 °С) в течение 15, 30 или 60 мин,

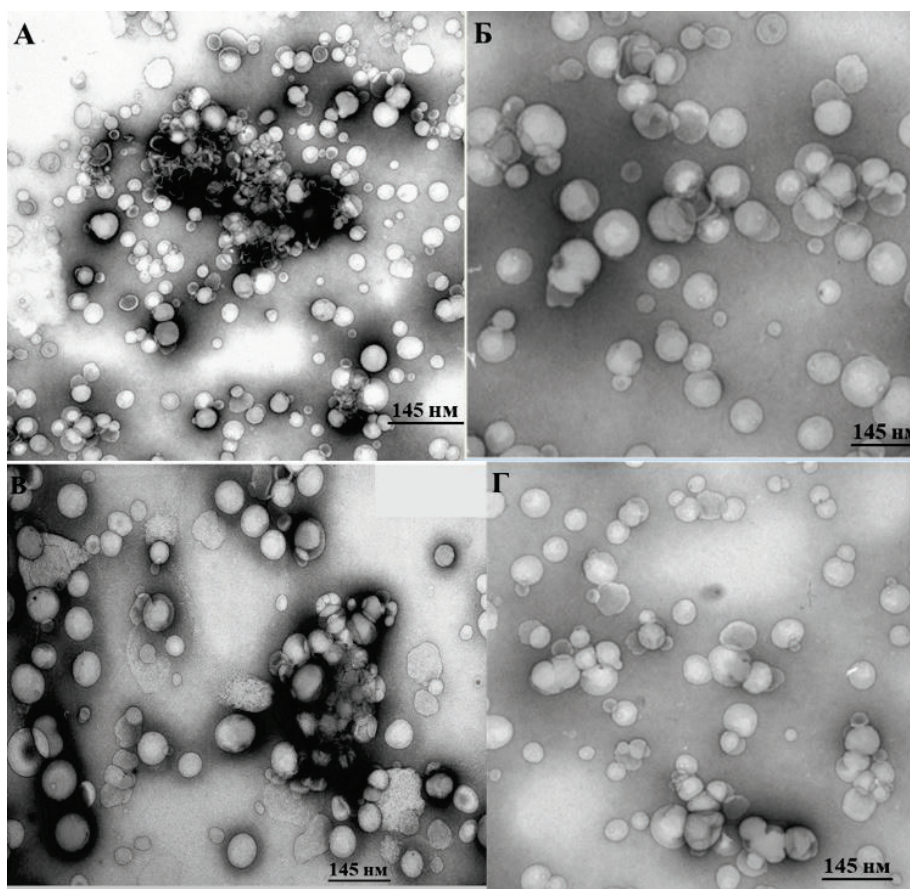


Рисунок 2. Электронные микрофотографии липосом: А – Лс ФХ; Б – Лс ФХ- Карн+ЛК; В – Лс ФХ+ХС- Карн+ЛК; Г – Лс ФХ+сахароза- Карн+. ЛК (Сфх=40 мг/мл, Схс=4 мг/мл, Слк =5 мг/мл, Скарн. =20 мг/мл)

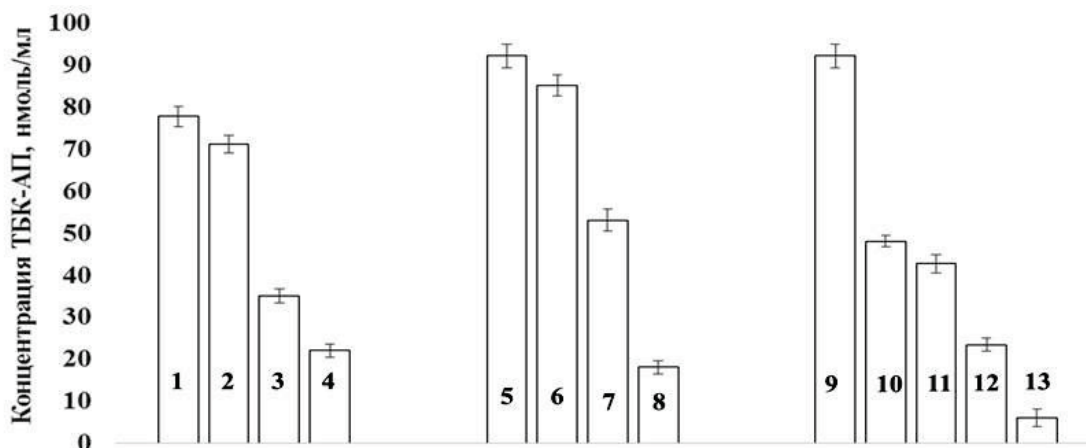


Рисунок 3. Влияние Карн и ЛК на концентрацию ТБК-АП в фосфолипидах: **1,5,9** – контроль, Лс-ФХ без антиоксидантов; **2,3,4** – реакция Фентона, проведённая при 100 °С в течение 15 мин; Лс ФХ-Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М); **6,7,8** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ-Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М); **10** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ-ЛК (5×10^{-3} М); **11,12,13** – реакция Фентона, проведённая при 37 °С в течение 60 мин, Лс ФХ ЛК (5×10^{-3} М) и Карн (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М)

соответственно, и определяли содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП). В качестве контроля использовали ФХ-липосомы, не содержащие данных антиоксидантов (рис. 3).

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при добавлении Fe^{2+} и H_2O_2 к ФХ-липосомам происходило накопление ТБК-АП (рис. 3, **1,5,9**). Добавление сульфата железа и пероксида водорода к Лс ФХ-Карн (10^{-3} , 10^{-2} М, рис. 3, **3,4, 7,8**) или ЛК (Слк= 5×10^{-3} М, рис. 3, **10**), приводило к значительному уменьшению (в 2-4 раза) содержания ТБК-АП (рис.3, **3,4,7,8,10**). При этом температура и время нагревания образцов никак не повлияли на антиоксидантные свойства субстанций. Наиболее эффективно антиоксидантные свойства проявляли липосомы, содержащие оба антиоксиданта (Скарн = 10^{-2} М, Слк= 5×10^{-3} М). При этом был отмечен синергетический эффект – липосомы, содержащие Карн и ЛК, в 15 раз эффективнее предотвращали накопление ТБК-АП по сравнению с контролем (рис. 3, **13**). Вероятнее всего проявление антиоксидантных свойств ЛК и Карн в данной биологической системе связаны с хелатированием ионов железа.

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 рис. 4.

В результате проведенных исследований было установлено, что липосомы, содержащие ЛК (2 мМ) и Карн (2,5 мМ), подавляют агрегацию Тц, обусловленную арахидоновой кислотой, на 50% относительно контролей (рис. 3). Вместе с этим, было показано, что липосомы с ЛК (2 мМ) и с Карн. (2,5 мМ) уменьшают степень агрегации тромбоцитов, индуцированную АК на 67 и 38%, соответственно. Однако, как Лс без антиоксидантов, так и водорастворимые формы препаратов липоевой кислоты и карнозина, практически не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов, вызванную данным индуктором. Вероятнее всего, что водорастворимые препараты

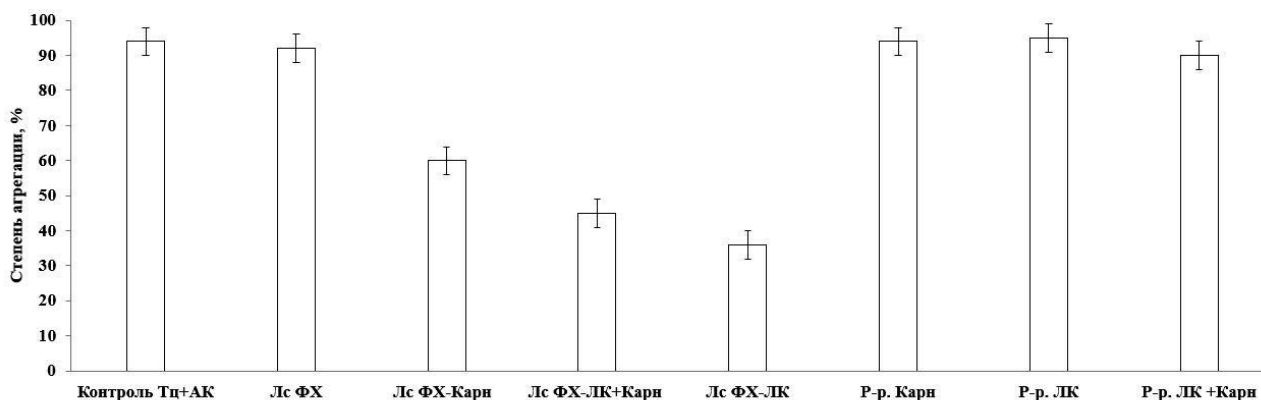


Рисунок 4. Влияние липосомальных и водорастворимых форм с липоевой кислотой карнозином на агрегацию тромбоцитов человека (здоровые доноры, $n=20$, 1×10^6 кл/мл), обусловленную арахидоновой кислотой

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 ($75\pm 5\%$) и карнозина ($63\pm 5\%$) в липосомы. Однако добавление холестерина или криопротектора сахарозы к ФХ-липосомам привело к незначительному уменьшению эффективности включения карнозина в наночастицы ($35-45\%$). Получение ФХ-липосом с ЛК и карнозином методом пассивной загрузки привело к значительному уменьшению степени включения карнозина (16%) в липосомы. При этом эффективность включения ЛК в ФХ-липосомы при использовании методов, как и пассивной так и активной загрузки практически не изменилась ($58-75\%$). Необходимо отметить, что полученные липосомальные препараты представляют собой однородную систему наночастиц с размером $150-250$ нм. Методом электронной микроскопии была изучена морфология липосомальных препаратов. Было обнаружено, что липосомы с ЛК+Карн. представляют гомогенную систему, состоящую в основном из сферических НЧ и практически одинакового размера. Было установлено, что полученные липосомальные препараты дисперсионно стабильны в течение длительного хранения (более 15 мес.) при комнатной температуре и не образуют никаких агрегатов НЧ.

На модели реакции Фентона показано антиоксидантное действие Карн, ЛК и их комбинированного препарата на образование продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Установлено, что при использовании концентрации ЛК 5×10^{-3} М и Карн 10^{-4} М – 10^{-2} М эти субстанции проявляют антиоксидантное действие, а в комплексном препарате ЛК+Карн проявляется их аддитивный эффект, приводящий к 15-кратному снижению концентрации ПОЛ.

Изучение влияния липосомальной формы карнозина 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.

Данная работа выполнена в рамках гос. задания (№ гос. регистрации НИОКТР АААА-А19-119100390063-9) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики "Базис" (№ гранта 22-1-1-28-1).

Авторы выражают благодарность Абдулджаббар Балсам Тарек за получение липосомальных препаратов, руководителю организации представительства компании "ЛИПОИД АГ" (Германия), г. Москва, к.х.н., Сымону Андрею Валентиновичу, за предоставление фосфатидилхолина Lipoid S-100 и вед. науч. сотр. лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний ИМБ РАН Попенко В. И. за определение морфологии нанодисперсий.

Список литературы / References:

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. nevrolog. and psichiatrist.*, 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. α -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., Жилиякова 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., 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.

LIPOSOMAL FORM WITH LIPOIC ACID AND CARNOSINE: PRODUCTION, ANTIPLATELET AND ANTIOXIDANT EFFECT

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

¹ MIREA – Russian Technological University

86 Vernadsky Ave., Moscow, 119571, Russia; e-mail: vasilij9999@yandex.ru

² Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of the Russian Federation

1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

³ V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of the Russian Academy of Sciences
1 Vvedensky Square, Fryazino, Moscow Region, 141190, Russia

⁴ Scientific Center of Neurology

Volokolamsk highway, 80, Moscow, 125367, Russia

Received 18.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0519

Abstract. Optimal conditions were selected for obtaining the liposomal form with lipoic acid (LA) and carnosine. Using methods of active and passive loading, it was possible to achieve high efficiency inclusion of carnosine (60±5%) and lipoic acid (75±5%) in nanoparticles (NPs). It has been shown that the addition of sucrose or cholesterol (Chol) to nanodispersions (NDs) led to a slight decrease in the efficiency incorporation of carnosine in nanoparticles (45±5%). The production of PC-liposomes (PC-Ls) with LA and carnosine by passive loading led to a significant decrease in the efficiency inclusion of carnosine in liposomes (16%). At the same time, the efficiency of inclusion of LA in PC liposomes using methods of both passive and active loading practically did not change (58-69%). It has been found that the obtained nanodispersions are homogeneous system of nanoparticles with size of 175-250 nm. By transmission electron microscopy, it has been shown that LA+Carn. Liposomes represent a homogeneous system consisting mainly of spherical nanoparticles with a size of 120-200 nm. It is important to note that the obtained liposomes with LA and carnosine are stable during long-term storage (15 months) at + 4 ° and at room temperature. It was established that liposomes LA with Carn exhibit an antioxidant effect, leading to a 15-fold decrease in the concentration of lipid peroxidation products. The effect of the obtained liposomal forms on platelet aggregation caused by arachidonic acid has been revealed. It has been found, that liposomes with LA and carnosine reduce the degree of aggregation of platelets by 60-70%, relative to controls.

Key words: lipoic acid, carnosine, nanoparticles, liposomes, platelets, arachidonic acid.