

УДК 615.032.13

©Коллектив авторов

## ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

*В.А. Щелконогов<sup>1</sup>, Г.М. Сорокоумова<sup>1\*</sup>, О.А. Баранова<sup>2</sup>, А.В. Чеканов<sup>2</sup>, А.В. Клочкова<sup>2</sup>, К.Д. Казаринов<sup>3</sup>,  
Э.Ю. Соловьева<sup>2</sup>, А.И. Федин<sup>2</sup>, В.И. Швеи<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Московский технологический университет (МИТХТ),

Москва, 119571, пр. Вернадского, д. 86; тел.: +7(495) 246-05-55 (доб. 9-28); эл. почта: galinams@ya.ru

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

Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

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

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

Подобраны условия для получения липосом из фосфатидилхолина (ФХ), содержащих  $\alpha$ -липовую кислоту (ЛК). Полученные ФХ липосомы, представляют собой частицы размером 175÷284 нм, характеризующиеся эффективностью включения субстанции равной 85% и медленным высвобождением ЛК из них. Установлено влияние как “пустых” липосом, так и липосомальной формы ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) крови человека, индуцированную арахидоновой кислотой (АК). Обнаружено, что “пустые” липосомы на 30% уменьшают агрегацию Тц, вызванную АК, а липосомы с ЛК подавляют её на 80%. Определено содержание тиобарбитурат продуктов (ТБКП), в образцах плазмы крови человека, обогащенной тромбоцитами, инкубированными с липосомальной ЛК. При этом показано, что ЛК в составе липосом сохраняет свои антиоксидантные свойства и содержание продуктов окисления в исследуемых образцах плазмы крови человека, дозозависимо уменьшается при использовании в качестве индуктора агрегации Тц арахидоновой кислоты.

**Ключевые слова:** липосомы, липовая кислота, тромбоциты, арахидоновая кислота

**DOI** 10.18097/PBMC20166205577

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема изучения особенностей течения патофизиологических процессов, связанных с цереброваскулярными расстройствами и их последствиями является ведущей для оценки состояния здоровья населения, и, в связи с этим, важное значение придается изучению патогенеза церебральной ишемии и разработке эффективных методов её лечения [1].

К основным патогенетическим механизмам сосудистых заболеваний головного мозга относят: снижение мозгового кровотока, возникновение и прогрессирование окислительного стресса, повреждения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и др. [2]. Терапия данной патологии включает применение препаратов, оптимизирующих метаболизм головного мозга, проявляющих антиоксидантное действие, препятствующих агрегации тромбоцитов, что позволяет обеспечить защиту нейронов от действия повреждающих факторов, лежащих в основе большинства клинических форм заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) [3, 4]. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга в настоящее время является  $\alpha$ -липовая кислота [5-7]. В условиях экспериментальной ишемии препараты,

содержащие ЛК, подавляют агрегацию Тц и снижают концентрацию малонового диальдегида (МДА) – основного биохимического маркера ишемического повреждения, являющегося вторичным продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8, 9]. Однако основными недостатками ЛК являются её плохая растворимость в воде (в водных растворах), быстрое связывание с различными белками [10] и, как следствие, плохая биодоступность. Исходя из этого факта, на сегодняшний день в медицинской практике применяются достаточно большие дозы препарата ЛК, что, в свою очередь, может вызывать нежелательные побочные эффекты. Как правило, практикуется внутривенное введение ЛК. Создание новых лекарственных форм данного препарата с целью улучшения биодоступности является актуальной проблемой в наши дни.

Наряду с этим, проведённые ранее исследования показали способность липосом, состоящих из различных липидов, оказывать ингибирующее действие на агрегацию Тц [11]. Таким образом, комбинированное использование антиагрегационного и антиоксидантного эффекта ЛК и собственной антиагрегационной способности липосом является перспективным для применения в терапии сосудистых заболеваний головного мозга. В связи с этим, **задачами данной работы** были создание новой лекарственной (липосомальной) формы ЛК,

*Принятые сокращения:* ФХ - фосфатидилхолин, ЛК - липовая кислота, Тц - тромбоциты, АК - арахидоновая кислота, ТБКП - тиобарбитурат продукты, МДА - малоновый диальдегид, ПОЛ - перекисное окисление липидов, ЦНС - центральная нервная система, ГЭБ - гематоэнцефалический барьер, ОЛВ- одноламеллярные везикулы.

\* - адресат для переписки

обладающей пролонгированным действием, а также изучение влияния полученных липосомальных форм ЛК на агрегацию тромбоцитов и на подавление процесса образования продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови здоровых доноров под действием индуктора агрегации тромбоцитов АК.

## МЕТОДИКА

### Материалы

В работе использовали фосфатидилхолин Lipoid S-100 94% чистоты, выделенный из бобов сои ("Lipoid GmbH", Германия),  $\alpha$ -липоевую кислоту ("Sigma-Aldrich", США), растворители: хлороформ, метанол, ацетон марки ХЧ ("Химмед", Россия). Для приготовления буферных растворов использовали ацетат натрия, трис, хлорид натрия, соляную и уксусную кислоты марки ЧДА ("Химмед", Россия). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали арахидоновую кислоту ("Ренам", Россия).

### Методы

Липосомы получали при помощи миниэкструдера "LiposoFast basic" ("Avestin Inc.", США), с использованием фильтров "Whatman" (США) с размером пор 100 или 200 нм.

Гель-хроматографическое разделение липосомальной и свободной ЛК проводили на колонке illustra NAP 5 с сорбентом Sephadex G-25 ("GE Healthcare", Великобритания).

Для взятия венозной крови использовали стандартные пробирки (V=4,5 мл) с антикоагулянтом цитратом натрия 3,2% Vacuette®, кат. №454329 (Австрия).

Плазму крови, обогащенную тромбоцитами, получали с использованием мультицентрифуги CM-6MT ELMi (Латвия), а центрифугирование дисперсии мультимеллярных везикул/вода проводили на центрифуге CM-50 ELMi (Латвия).

Спектры в видимой и ультрафиолетовой областях регистрировали на спектрофотометре SHIMADZU UV-1601, P/N 206-67001 (Япония), агрегацию тромбоцитов фиксировали на четырёхканальном агрегометре AggRAM, "Helena Laboratories Bioscience" (США). Для определения размеров частиц методом динамического светорассеяния использовали прибор Delsa Nano C, "Beckman Coulter Inc." (США).

Коэффициент распределения ЛК в системе мультимеллярные везикулы/вода определяли следующим образом: 20 мг ФХ и 5 мг ЛК растворяли в этаноле с последующим удалением растворителя на ротаторном испарителе, полученную липидную плёнку диспергировали 1 мл буферного раствора с соответствующим значением pH (4,8; 5,75; 6,55; 7,4). Полученную дисперсию центрифугировали в течение 10 мин при 2500 g. Содержание ЛК в липидной фазе (осадок) после растворения её в этаноле определяли спектрофотометрическим методом. Коэффициент распределения в системе липиды/вода рассчитывали по следующей формуле:

$$K_d = \frac{C^L}{C^W} = \frac{m^L}{m^W} \times \frac{V^W}{V^L},$$

где  $C$  – концентрация ЛК в соответствующей фазе (мг/мл),  $m$  – масса ЛК (мг),  $V$  – объём фазы (мл), индексы L и W соответствуют липидной и водной фазам.

Одноламеллярные везикулы (ОЛВ), содержащие ЛК, получали методом пассивной загрузки, путём диспергирования липидной плёнки. Исходное количество липидов (20–60 мг) растворяли в этанольном растворе, содержащем 5–10 мг ЛК, и упаривали растворитель на ротаторном испарителе. Липидную плёнку диспергировали 1 мл буферного раствора с соответствующим значением pH (4,8; 5,75; 6,55; 7,4), замораживали и оттаивали 5 раз. ОЛВ получали методом экструзии, используя поликарбонатный ядерный фильтр с диаметром пор 100 нм. Отделение ОЛВ с включённой в них субстанцией от свободного препарата проводили методом гель-хроматографии на сорбенте Sephadex G-25. Содержание ЛК в липосомах определяли спектрофотометрическим методом после их разрушения этанолом.

Эффективность включения (ЭВ) ЛК в липосомы вычисляли по формуле:

$$\text{ЭВ} = \frac{m_{\text{ЛК в липосомах}}}{m_{\text{ЛК исх.}}} \times 100\%,$$

а степень загрузки (СЗ) ЛК в липосомы:

$$\text{СЗ} = \frac{m_{\text{ЛК в липидах}}}{m_{\text{липидов}}} \times 100\%,$$

Размеры липосом определяли турбидиметрическим методом и методом динамического рассеивания света.

Кинетику высвобождения ЛК из ОЛВ и из водно-спиртового раствора измеряли при помощи диффузионной ячейки Франца в течение 22 ч. В качестве мембраны использовали ядерный фильтр с диаметром пор 200 нм. В качестве акцепторного раствора использовали буфер трис-НСl (pH=7,4) с температурой 20°C. Содержание ЛК в акцепторном растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 330 нм.

Определение ТБК-продуктов в плазме крови проводили по стандартной методике [12]. Для исследования использовали обогащённую тромбоцитами плазму крови (0,5 мл) с добавленным индуктором агрегации Тц (АК, 25 мкл,  $C = 1$  мг/мл) и с липосомальной ЛК, или с "пустыми липосомами" в количестве 0,5; 0,8 и 1 мМ. К этим образцам добавляли 3,0 мл свежеприготовленного раствора тиобарбитуровой кислоты в трихлоруксусной кислоте, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем измеряли оптическую плотность анализируемого образца относительно реагента при 580 и 532 нм и рассчитывали содержание в пробе ТБКП по формуле:

$$C = (D_{532} - D_{580}) \times 6 \times 1000 / 155, \text{ (нмоль ТБКП/мл)}.$$

## Подготовка образцов крови

Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови, взятых у здоровых доноров. У всех участников было получено добровольное согласие на взятие биоматериала. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием крови в течение 10 мин при 135 g при комнатной температуре.

Отбирали надосадочную жидкость, затем осадок центрифугировали в течение 20 мин при 840 g для получения обеднённой тромбоцитами плазмы (ОТП).

## Метод исследования процесса агрегации тромбоцитов

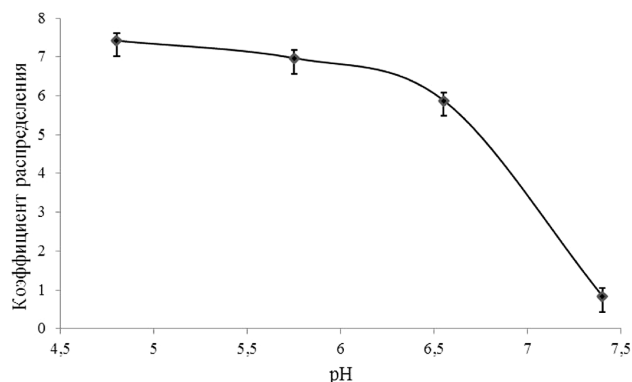
Для проведения измерений агрегации Тц был использован четырёхканальный агрегометр "Helena AggRAM". В качестве индуктора агрегации использовали арахидоновую кислоту. "Пустые" липосомы и липосомы с ЛК добавляли в объёмах (5, 8, 10 мкл) и инкубировали в течение 1 мин,  $T=37^{\circ}\text{C}$ . Агрегатограмму фиксировали по стандартной методике в течение 10 мин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA версия 6, StatSoft Corporation (США). Для анализа различий количественных признаков в трёх и более несвязанных группах использовали статистический критерий Краскелла-Уоллиса ANOVA, в двух несвязанных группах применяли критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при  $p<0,05$  [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липовая кислота представляет собой кристаллический порошок светло-жёлтого цвета, с мало ощутимым запахом. Она плохо растворима в воде, хорошо – в растворах щелочей и органических растворителях [14]. Известно, что  $pK_a$  ЛК равно 4,52 [15] и, следовательно, в растворах со значениями  $pH$  5,7-7,4 она находится в ионизированной (анионной) форме, что должно улучшать её растворимость. Однако, нами было определено, что в водных растворах со значениями  $pH \geq 6,6$  растворимость ЛК составляет  $2,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л при нагревании до температуры  $60^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, создание водорастворимой формы ЛК является актуальной задачей. Один из подходов к её решению – создание липосомальной формы ЛК.

Первоначально, нами были экспериментально определены и рассчитаны коэффициенты распределения ЛК в системе липиды/вода при различных значениях  $pH$ : 4,8; 5,75; 6,55 и 7,4. Полученные результаты, представленные на рисунке 1, показывают, что ЛК



**Рисунок 1.** Зависимость коэффициента распределения  $\alpha$ -липоевой кислоты в системе липиды/вода от  $pH$  среды.

проявляет свойства амфифила и при определённых условиях преимущественно находится либо в гидрофобной (липидной), либо в водной фазе. Определено, что при увеличении  $pH$  растворов происходит уменьшение значения коэффициента распределения ЛК в системе липиды/вода, что подтверждает её лучшую растворимость в этих условиях. При  $pH \leq 5$  ЛК лучше включается в липидную фазу, это значит, что липосомы возможно использовать для её сольubilизации.

Для определения, максимально возможного исходного количества ЛК для включения в липосомы, были выбраны такие её количества как 5, 7 или 10 мг. Липосомы получали из ФХ ( $C=40$  мг/мл) по методике "пассивной" загрузки, диспергируя липидную плёнку буферным раствором трис- $\text{HCl}$  ( $pH=7,4$ ) с последующей экструзией. При использовании 5 мг ЛК для получения её липосомальной формы было обнаружено, что около 85% ЛК включилось в липосомы. Это позволило улучшить её растворимость в воде в 10 раз. Получение липосом при использовании 7 мг или 10 мг ЛК было затруднено, так как часть кристаллов субстанции в комплексе с липидами оставалась на фильтре. В результате эффективность включения ЛК в липосомы составила 35-40%. Таким образом, в дальнейших исследованиях мы использовали 5 мг ЛК для включения её в липосомы.

На следующем этапе работы проводили подбор оптимальных условий для создания липосом с наиболее эффективным включением в них ЛК. Для этого исследовали влияние на эффективность включения таких параметров как: количество ФХ ( $C_{\text{исх.}} = 20, 40, 60$  мг/мл) и  $pH$  растворов (4,8; 5,75 и 7,4) диспергирования. В результате были получены ФХ липосомы с липовой кислотой, характеристики которых представлены в таблице.

**Таблица.** Характеристика липосомальных форм ЛК: эффективность включения (ЭВ), степень загрузки (СЗ) и размеры липосом из фосфатидилхолина ( $C_{\text{исх.}}$  ЛК= 5 мг/мл)

$C_{\text{исх.}}$ ФХ мг/мл	Ацетатный буферный раствор ( $pH=4,8$ )		0,9% раствор NaCl ( $pH=5,75$ )		Буферный раствор трис- $\text{HCl}$ ( $pH=7,4$ )		Размер липосом, нм
	ЭВ (%)	СЗ (%)	ЭВ (%)	СЗ (%)	ЭВ (%)	СЗ (%)	
20	18±5	4	45±5	11	24±5	6	175
40	53±5	7	68±5	9	85±5	11	210
60	56±5	5	60±5	13	92±5	8	284

## ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Анализ полученных результатов показал, что с повышением pH среды диспергирования ФХ-ЛК плёнки и концентрации ФХ происходит увеличение степени включения ЛК в липосомы (таблица). Это связано с тем, что растворимость ЛК в водной фазе увеличивается при pH 7,4, а с повышением концентрации липидов происходит увеличение размеров липосом, площади липидного бислоя и количества самих липосом. Наибольшее из исследуемых значений концентраций ФХ=60 мг/мл, позволяет достичь максимальной величины эффективности включения ЛК в липосомы, но при этом возрастает размер липосом. Мы считаем, что оптимальным препаратом являются липосомы с размером частиц 210 нм, с исходной концентрацией ФХ=40 мг/мл в буферном растворе трис-HCl (pH=7,4), имеющие эффективность включения ЛК в липосомы равную 85% (таблица). Можно предположить, что в этом препарате часть ЛК располагается в водной фазе, а часть в липидном бислое, что хорошо согласуется с амфифильными свойствами ЛК и подтверждается экспериментами по кинетике высвобождения ЛК из липосом.

Скорость высвобождения ЛК определяли при помощи ячейки Франца в течение 22 ч. В качестве акцепторного раствора использовали буфер трис-HCl (pH 7,4) при температуре 20°C. Первые 3-4 пробы отбирали каждые 60 мин в течение 4 ч, а последние пробы отбирали после 22 ч, затем спектрофотометрически определяли в них содержание ЛК. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

Анализ результатов показал, что из ФХ липосом за 22 ч высвободилось 43% ЛК, а из водно-спиртового раствора ЛК высвободилась практически полностью (97%).

Данную кинетику высвобождения ЛК можно объяснить следующим образом: в первый момент времени из липосом в окружающую среду высвобождается ЛК, которая, по-видимому, находится в водной полости липосомы и легко переходит в раствор по градиенту концентраций, а ЛК из липидного бислоя липосом диффундирует очень медленно и может выделяться в раствор только при разрушении бислоя. Такой процесс

высвобождения ЛК из ФХ липосом может обеспечить пролонгированное действие препарата в организме.

Общеизвестно, что в процессе ишемического инсульта развивается воспалительная реакция как ответ организма на повреждение сосудистого эндотелия, а в случае инфаркта мозга происходит проникновение токсических веществ из сосудистого русла в мозговую ткань. Это вызывает запуск каскада окислительных и прокоагулянтных реакций, в результате которых происходит активация клеток микроглии, что приводит к главной утрате – гибели жизненно важных нейронов с формированием инфарктного очага.

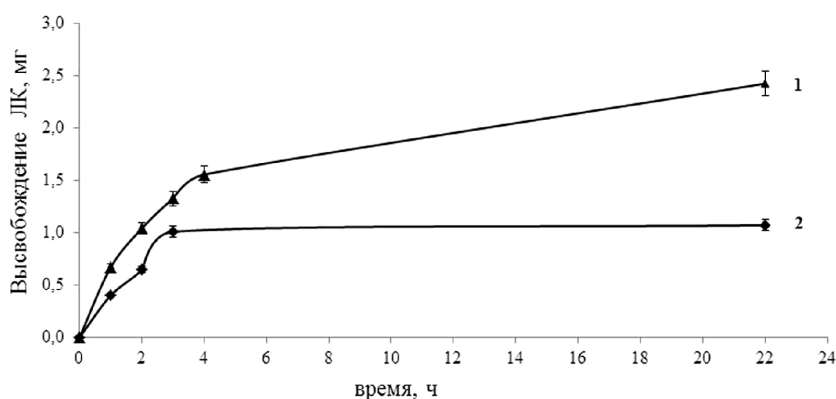
Для предотвращения данного патологического процесса и снижения последствий от его наличия, необходимо воздействовать на систему гемостаза, чтобы нарушить “замкнутый” сигнальный круг [16-18].

В связи с этим, на завершающем этапе данной работы изучали антиагрегационные и антиоксидантные свойства липосомальной формы ЛК.

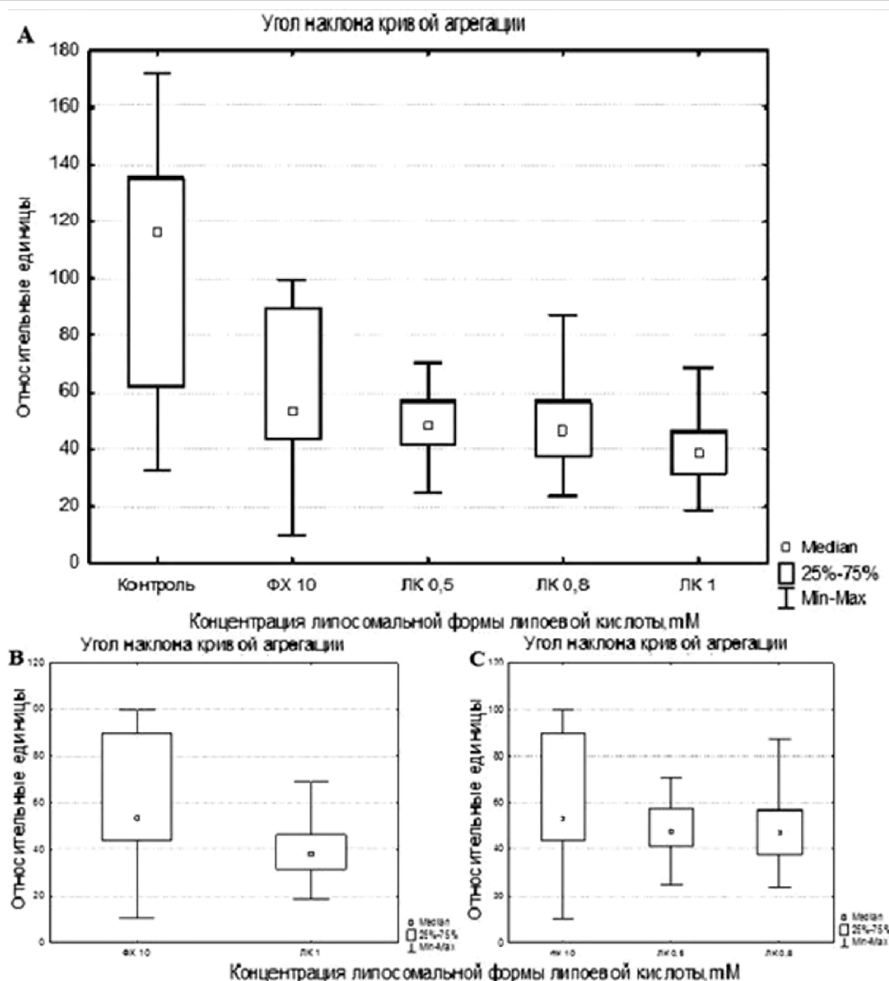
В экспериментах *in vitro* на образцах крови, полученных от условно здоровых лиц, тестировали липосомальную форму  $\alpha$ -липоевой кислоты в сравнении с “незагруженными” фосфатидилхолиновыми липосомами.

На рисунке 3А представлены результаты, полученные при расчёте кривой агрегации в исследуемых образцах крови доноров. Видно, что фосфатидилхолиновые липосомы сами по себе обладают выраженным антиагрегационным эффектом (существенным образом различаются значения медиан, а также верхних и нижних квартилей в группах контроля и “пустых” липосом ( $p < 0,05$ )). При этом достоверные различия влияния на тромбоциты липосомальной формы  $\alpha$ -липоевой кислоты были обнаружены только в концентрации ЛК 1 мМ (рис. 3В), тогда как в концентрациях 0,5 мМ и 0,8 мМ отличия не значимы (рис. 3С). Другими словами, можно сказать, что выявлена минимальная рабочая доза исследуемого препарата.

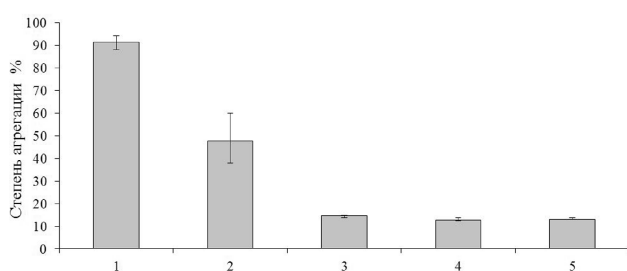
При этом следует отметить, что степень агрегации тромбоцитов уменьшается при увеличении концентрации препарата ЛК в липосомальной форме (рис. 4).



**Рисунок 2.** Зависимость высвобождения ЛК (масса исходного количества ЛК  $m_{\text{исх.ЛК}}=5$  мг/мл, объём липосом внесённый в ячейку  $V=0,5$  мл) из ФХ липосом от времени (1 - водно-спиртовой раствор ЛК, 2 - липосомальная форма ЛК).



**Рисунок 3.** Угол наклона кривой агрегации. А. Сравнение с контролем (контроль - тромбоциты + арахидоновая кислота) “пустых” липосом (ФХ 10) и липосом, нагруженных ЛК в различных концентрациях. В, С. Величина кривой агрегации при различных концентрациях ФХ и ФХ с ЛК.



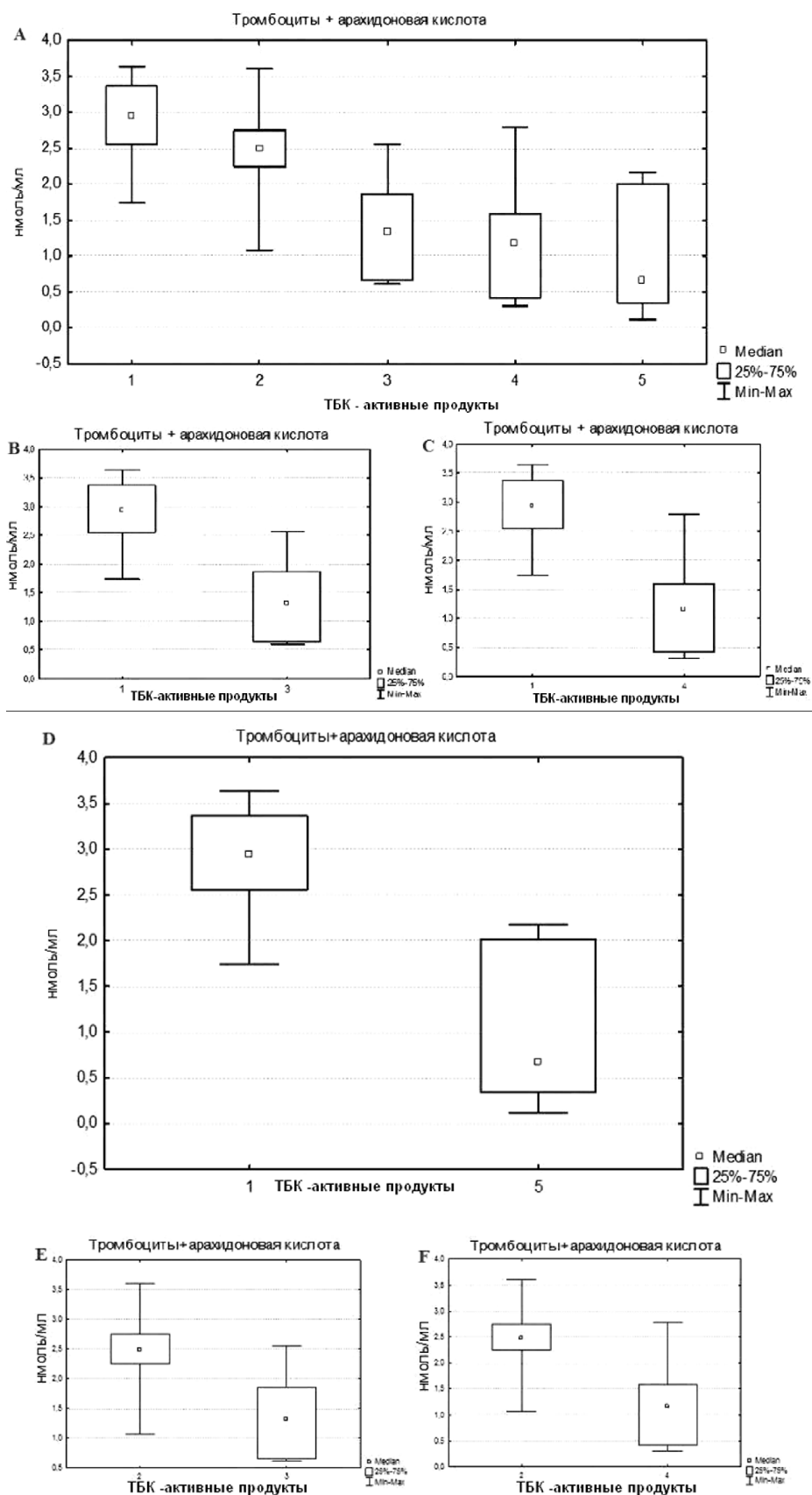
**Рисунок 4.** Влияние липосомальной формы ЛК на агрегацию тромбоцитов человека ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл), вызванную индуктором арахидоновой кислотой. (1. Контроль: Тромбоциты + АК; 2. Тромбоциты + “пустые” липосомы (ФХ 10) + АК; 3. Тромбоциты + ЛК 0,5 mM + АК; 4. Тромбоциты + ЛК 0,8 mM + АК; 5. Тромбоциты + ЛК 1 mM + АК).

Кроме того, было определено влияние ЛК на накопление продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови человека после индукции агрегации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Антиоксидантную способность ЛК оценивали по содержанию ТБКП, в образцах плазмы обогащённой тромбоцитами, инкубированными с индуктором агрегации (арахидоновой кислотой) и липосомальной формой ЛК.

В результате данных исследований было показано, что в процессе агрегации тромбоцитов, вызванном АК, индуцируется окисление липидов плазмы крови, обогащённой тромбоцитами (вклад в содержание ТБКП самой АК был учтён). Введение в образцы плазмы крови ЛК достоверно ( $p < 0,05$ ) уменьшает содержание ТБКП дозозависимым образом, то есть концентрация ТБКП снижается при увеличении количества ЛК (рис. 5 А,В,С,Д,Е,Ф). Данное утверждение также вытекает из сравнения значений медиан и верхних и нижних квартилей во всех исследуемых группах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы были подобраны оптимальные условия для получения липосомальной формы ЛК, которая имеет максимальную степень включения субстанции в липосомы и обладает пролонгированным высвобождением её. Было обнаружено, что “пустые” липосомы незначительно (на 30%) уменьшают агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, а липосомы с ЛК ( $C = 0,5$  mM) на 80% ингибируют агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой.



**Рисунок 5.** Влияние липосомальной формы ЛК на накопление продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови человека при использовании в качестве индуктора агрегации Тц арахидоновой кислоты. А. Сравнение с контролем (1. Контроль: Тромбоциты + АК; 2. Тромбоциты + “пустые” липосомы (ФХ 10) + АК; 3. Тромбоциты + ЛК 0,5 мМ + АК; 4. Тромбоциты + ЛК 0,8 мМ + АК; 5. Тромбоциты + ЛК 1 мМ + АК). В, С, Д, Е, Ф. Попарное сравнение накопления продуктов перекисного окисления липидов.

Определение количества продуктов перекисного окисления липидов в образцах плазмы, обогащенной тромбоцитами, инкубированными с индуктором агрегации АК и липосомальной ЛК, показало, что в такой форме ЛК сохраняет свои антиоксидантные свойства, и содержание продуктов окисления уменьшается при использовании в качестве индуктора активации тромбоцитов арахидоновой кислоты.

Предполагаемым механизмом антиагрегационного действия липосомальной ЛК можно считать ингибирование процесса перекисного окисления экзогенно добавленного индуктора АК (путь образования гидропероксиэйкозотетраеновой и гидроксиэйкозотетраеновых кислот под действием липоксигеназы).

Предполагается, что после проведения дополнительных исследований, липосомальную форму ЛК можно будет применять в комплексной терапии ишемии головного мозга.

*Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ. Регистрационный номер НШ-7946.2016.11.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Бурчинский С.Г. (2006) Статьи института геронтологии АМН Украины, **14**, 15-18.
- Гусев Е.И., Скворцова В.И. (2001) Ишемия головного мозга. "Медицина", 328 с.
- Путилина М.В. (2005) Хроническая ишемия мозга. Лечащий врач, **6**, 9-14.
- Котова О.В., Акарачкова Е.С. (2010) Фарматека, **8**, 57-61.
- Соловьева Э.Ю., Миронова О.П., Баранова О.А., Бекман Э.М., Асейчев А.В., Федин А.И., Азизова О.А. (2008) Журн. неврол. психиат., **108**, № 6, 37-42.
- Mitsui Y., Sahmelzer J.D., Zollman P.J. et al. (1999) J. Neurolog. Sci., **163**, 11-16.
- Wayne M., Clark M.D., Rinker L.G. et al. (2001) Stroke, **32**, 37-42.
- Бурчинский С.Г. (2009) Межд. неврол. журнал, **1**, 98-102.
- Одинак М.М., Вознюк И.А., Мельникова Е.В. и др. (2007) Consilium Medicum, **7**, №8, 179-183.
- Akiba S., Matsugo S., Packer L., Konishi T. (1998) Analytical Biochemistry, **2**, 299-304.
- Суслина З.А., Сейфулла Р.Д., Ионова В.Г., Каплун А.П., Прохоров Д.И., Шилова А.Г. (2011) Экспер. клин. фармакол., **74**, №5, 31-34.
- Uchiyama M., Mihara M. (1978) Analyt. Biochemia, **86**, 271-278.
- Реброва О.Ю. (2006) Статистический анализ медицинских данных. Медиа Сфера, М., с. 166-176.
- Липоевая кислота. Медицинская энциклопедия. <http://www.medical-enc.ru/m/11/lipoevaya-kislota.shtml> (дата обращения 04.05.2016).
- Chemicalize.org. free chemical structure miner and web search engine developed. Owned by ChemAxon. <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=lipoic+acid&source=fp> (дата обращения 04.05.2016).
- Schrör K. (1995) Antiplatelet Drugs. A Comparative Review, **50**, Issue 1, 7-28.
- Lai Y.-S., Shin C.-Y., Huang Y.-F., Chou T.-C. (2010) Food Chem., **58**, 8596-8603.
- Кузник Б.И. (2010) Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Экспресс-издательство. Чита, с. 369-410.

Поступила: 13. 09. 2016.  
Принята к печати: 17. 10. 2016.

## LIPOSOMAL FORM OF LIPOIC ACID: PREPARATION AND DETERMINATION OF ANTIPLATELET AND ANTIOXIDANT ACTIVITY

V.A. Shchelkonogov<sup>1</sup>, G.M. Sorokoumova<sup>1</sup>, O.A. Baranova<sup>2</sup>, A.V. Chekanov<sup>2</sup>, A.V. Klochkova<sup>2</sup>, K.D. Kazarinov<sup>3</sup>, E.Y. Solovieva<sup>2</sup>, A.I. Fedin<sup>2</sup>, V.I. Shvets<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow technological University (MITHT),

86 Vernadsky av., Moscow, 119571 Russia; tel.: +7(495) 246-05-55 (ext. 9-28); e-mail: galinams@ya.ru

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

1 Ostrovitianov str., Moscow, 117997 Russia

<sup>3</sup>Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, (Fryasino branch),

1 Vvedensky sq., RAS, Fryazino, Moscow region, 141190 Russia

Optimal conditions for obtaining phosphatidylholine (PC) liposomes with lipoic acid (LA) are chosen that lead to the formation of nanoparticles with a size of 175÷284 nm with efficiency (extent) of inclusion of LA in liposomes equal 85% and characterized by a slow release of substance from the nanoparticles. The effect of "empty" liposomes and liposomal form of LA on platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA) is established. It is found that liposomes with LA inhibit platelet aggregation, caused by AA, to 80%. In addition, it is shown that "empty" liposomes slightly (to 30%) suppress platelet aggregation, caused by AA. The amount of TBA-sensitive products in samples of platelet-rich plasma (PRP) incubated with liposomal LA is determined. It is shown that LA in the composition of liposomes retains its antioxidant properties, and the amount of products of lipid peroxidation in platelet-rich plasma decreases in a dose-dependent manner when arachidonic acid is used as an inductor of platelet aggregation. It is assumed that the antiplatelet action of the liposomal form of LA is induced by inhibition of the initiation of lipid peroxidation products caused by exogenous inducer AA. It is supposed that, after additional research, the liposomal form of LA can be considered as a new drug in complex treatment of cerebral ischemia.

**Key words:** liposomes, lipoic acid, platelet, arachidonic acid