

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.032

©Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ ВСТРАИВАНИЯ РЕСВЕРАТРОЛА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА В ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ИХ БИОДОСТУПНОСТЬ И СПЕЦИФИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Д.А. Гусева<sup>1</sup>, Ю.Ю. Худоклинова<sup>2</sup>, Н.В. Медведева<sup>3</sup>, В.С. Баранова<sup>3</sup>,  
Т.С. Захарова<sup>3</sup>, Е.Б. Артюшкова<sup>4</sup>, Т.И. Торховская<sup>3\*</sup>, О.М. Ипатова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет технологий и управления  
имени К.Г. Разумовского, Москва

<sup>2</sup>ООО “ИБМХ – ЭкоБиоФарм”, Москва

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
Москва, 119121, ул. Погодинская, д. 10; тел.: 8-499-248-40-08; эл. почта: torti@mail.ru

<sup>4</sup>Курский государственный медицинский университет, Курск

Исследовали биодоступность и активность композиции природных полифенолов – ресвератрола (РЕС) и дигидрокверцетина (ДГК) – в составе фосфолипидных наночастиц.

Сравнение специфических свойств РЕС и ДГК в составе композиций со свойствами соответствующих свободных субстанций проводили в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Предварительная инкубация липопротеинов низкой плотности (ЛНП) из плазмы крови здорового донора с РЕС или ДГК в составе фосфолипидных наночастиц замедляла окисление липидов, индуцированное  $\text{Cu}^{2+}$  в большей степени в сравнении со свободными соединениями и уменьшала образование продуктов перекисного окисления (ПОЛ). Биодоступность РЕС и ДГК при пероральном введении крысам в составе фосфолипидных композиций повышалась в 1,5-2 раза. На модели острой гипоксии при профилактическом двухнедельном введении РЕС и ДГК в составе фосфолипидных композиций было показано увеличение продолжительности жизни животных на 25%, возрастание активности каталазы в гомогенатах головного мозга в 1,5 раза.

На модели эндотелиальной дисфункции у крыс, индуцированной снижением синтеза NO, было установлено, что на фоне РЕС ингибирующее действие L-NAME – ингибитора синтеза оксида азота – заметно снижается. При этом РЕС в составе фосфолипидных наночастиц оказывал аналогичное действие при дозе в 10 раз меньшей. Нагрузочная проба с сопротивлением (пережатие восходящей аорты на 30 с) показала, что фосфолипидная композиция РЕС оказывает более эффективное протекторное действие за счёт стимуляции эндотелиальной NOS.

**Ключевые слова:** ресвератрол, дигидрокверцетин, фосфолипидные наночастицы, биодоступность, гипоксия, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.18097/PBMC20156105598

## ВВЕДЕНИЕ

Природные соединения с высокой биологической активностью давно используются в медицине в комплексном лечении и профилактике многих заболеваний. Существенное внимание в этом плане уделяется флавоноидам и ряду других естественных полифенолов, что обусловлено их способностью оказывать позитивное влияние на ряд метаболических процессов. Существует мнение, что флавоноиды влияют на структуру рафтов биомембраны и, тем самым, на процессы эндоцитоза и передачи сигналов в клетку с участием мембранных белков [1].

Среди этих соединений особое место занимают ресвератрол и дигидрокверцетин [2-4] (рис. 1).

Оба полифенола, наряду с наиболее хорошо изученным антиоксидантным действием [3, 4], обладают также широким спектром биологических эффектов. Так, показано их ангиопротекторное, иммуностимулирующее, противовоспалительное, антигипоксическое действие, способность нормализовать различные метаболические процессы в клетках, а также улучшать капиллярное кровообращение [2-4]. Механизмы не всех этих эффектов выяснены. Определены несколько “молекулярных мишеней” ресвератрола (РЕС) и

\* - адресат для переписки

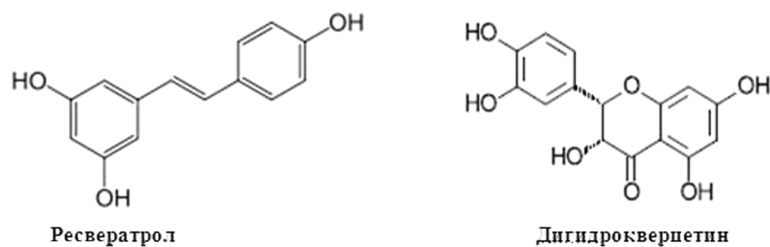


Рисунок 1. Структурные формулы ресвератрола и дигидрокверцетина.

дигидрокверцетина (ДГК). Например, доказана их способность повышать экспрессию эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [3, 5]. РЕС регулирует тонус сосудов, влияя на синтез высокоактивного вазоконстриктора эндотелина-1, а также индуцирует экспрессию фосфатидилинозит-3-киназы [5]. Отмечено активирующее воздействие РЕС на митохондрии за счёт стимуляции АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК) [4], влияние на факторы свертывания крови, внеклеточный матрикс [6], воздействие на циклооксигеназу (ЦОГ) (в основном, изофермент ЦОГ-1) и ядерные рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором (PPAR) [6]. ДГК, как и другие флавоноиды, влияет на эндотелиальные факторы (EDHF, PGI<sub>2</sub>), молекулы адгезии и клеточных контактов, CD31 [7, 8].

Участие РЕС и ДГК в регуляции множества метаболических процессов составляет основу лечебно-профилактического действия при терапии различных патологий [2-4]. Многочисленные данные о биологической активности РЕС и ДГК объясняют их активное использование в составе различных лечебно-профилактических препаратов [4]. Однако, из-за плохой растворимости биодоступность этих соединений низка, что в целом препятствует их широкому применению [9, 10]. Для преодоления этих недостатков в ряде работ ДГК [11] и РЕС [12, 13] включали в липосомы, наблюдая при этом повышение их биологических эффектов.

Доказано, что уменьшение размера транспортных наночастиц оказывает существенное влияние на биодоступность включаемых в них соединений [14, 15]. Нами ранее разработана система на основе фосфолипидных наночастиц с диаметром до 30 нм [16] для транспорта лекарств в организме. Показано изменение специфической активности ряда лекарственных препаратов при включении в эту систему [14, 15].

Целью настоящей работы было исследование влияния встраивания РЕС и ДГК в фосфолипидные наночастицы на их биодоступность и некоторые специфические свойства (антиоксидантное, антигипотоксическое действие и эндотелиопротективную активность).

## МЕТОДИКА

В работе использовали соевый фосфолипид фирмы Липоид ГмБХ (Германия) Lipoid S100

с содержанием фосфатидилхолина  $\geq 96\%$ , моногидрат мальтозы (“Merck”, Германия), ресвератрол (транс-ресвератрол Ресвида, “Resvida”, Швейцария) и дигидрокверцетин (“Лавитол, (дигидрокверцетин)”, Россия). Композиции фосфолипидных наночастиц получали, как описано в патенте [16]. Для этого 5 г фосфолипида и 0,5 г РЕС или ДГК суспендировали в 100 мл 20% раствора мальтозы в деионизированной воде. Полученную грубую эмульсию гомогенизировали с использованием микрофлюидайзера Microfluidizer Processor, M110 EN-30K (США) под давлением 1500-2000 бар при 40-55°C, фильтровали под давлением на установке Millipore Corporation (США), разливали в стерильные флаконы по 10 мл и подвергали лиофилизации. Перед экспериментами лиофилизаты разводили водой для инъекций.

Размер наночастиц в полученной эмульсии, определяемый с использованием лазерного корреляционного спектрометра N5 Submicron particle analyzer (“Beckman-Coulter Inc.”, США), был не более 30 нм и сохранялся после регидратации лиофилизата [14].

Антиоксидантное действие разработанных композиций *in vitro* исследовали по их способности тормозить инициируемое ионами меди окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Препараты ЛНП ( $1,006 \text{ г/мл} \leq d \leq 1,067 \text{ г/мл}$ ) выделяли из крови здорового донора центрифугированием при 40000 об/мин на ультрацентрифуге L8-M (“Beckman Instrument, Inc.”) в роторе Ty 65 в течение 17 ч [17]. Полученные ЛНП диализовали против  $\text{K}^+\text{-Na}^+$  фосфатного буфера, pH 7,2, после чего инкубировали 20-30 мин в присутствии РЕС (33 мкг/мл) или ДГК (9 мкг/мл). Фосфолипидные композиции добавляли в виде эмульсии, а свободные субстанции предварительно растворяли в 20 мкл этанола. После этого добавляли  $\text{CuSO}_4$  до конечной концентрации 0,3 мМ и регистрировали оптическую плотность при 234 нм, свидетельствующую о накоплении продуктов окисления липидов – диеновых конъюгатов. Результаты представляли в виде изменений  $(D_{234}^t - D_{234}^0) \times 100 = f(t)$ , где  $D_{234}^0$  – начальное значение оптической плотности при 234 нм,  $D_{234}^t$  – значение оптической плотности в момент времени  $t$ .

Оценку биодоступности полученных композиций в сравнении со свободными субстанциями проводили на крысах-самцах породы Wistar массой 300-400 г. Препараты вводили крысам перорально в объёме 1 мл

в дозе 15 мг/кг (РЕС) и 9 мг/кг (ДГК). Забор крови осуществляли из хвостовой вены в пробирки с ЭДТА через определённые интервалы времени в течение 60-80 мин. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R при 4°C 30 мин при 4000 об/мин. Анализируемые полифенолы экстрагировали из плазмы инкубацией с 9-кратным объёмом метанола в течение 5-6 мин, с последующим центрифугированием на той же центрифуге в течение 10 мин при 10000 об/мин, и отбирали надосадочные фракции для анализа.

Определение количества аналитов в образцах проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100, соединённого с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent G1956B ("Agilent Technologies", США). В работе использовали колонку с обращённой фазой ЭкоНова ProntoSIL C-18; элюцию проводили ацетонитрилом с 0,1% водным раствором муравьиной кислоты. Концентрацию ацетонитрила в подвижной фазе подбирали индивидуально для каждого лекарственного соединения. Температура колонки была 25°C, скорость потока элюента – 0,2 мл/мин. Объём образца, вносимого в колонку, составлял 10 мкл. Для количественного определения исследуемых веществ предварительно были построены калибровочные зависимости.

Антигипоксическое действие антиоксидантов изучали на модели острой гипоксии [18], регистрируя продолжительность жизни животных. Исследуемые композиции или свободные субстанции вводили *per os* белым нелинейным мышам ежедневно в течение 15 дней (20 мг/кг ДГК или 100 мг/кг РЕС). Контролем служили интактные животные. После гибели у каждого животного *ex tempore* извлекали оловный мозг. Активность каталазы – как показатель защитного ответа на гипоксию [19] – определяли в гомогенате тканей мозга.

Эндотелиопротективную активность ресвератрола, включённого в фосфолипидные наночастицы, исследовали на модели эндотелиальной дисфункции, вызванной дефицитом NO. Для этого использовали введение ингибитора NOS нитро-L-аргинина в виде метилового эфира (L-NAME) [20, 21]. Крысам-самцам породы Wistar массой 250-300 г вводили L-NAME один раз в сутки внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг в течение 7 дней. Препараты РЕС вводили внутривенно через 30 минут после введения L-NAME: свободный РЕС в дозе 2 мг/кг, а РЕС в составе фосфолипидных наночастиц в дозе 0,15 мг/кг (по РЕС). После окончания эксперимента определяли содержание стабильных метаболитов NO в крови животных (как косвенный показатель активности eNOS) [21]. Принцип метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования сульфаниламида нитритом. Уровень метаболитов NO (то есть, суммарную концентрацию нитратов и нитритов) определяли колориметрическим методом по развитию окраски в реакции диазотирования [21]. Результаты

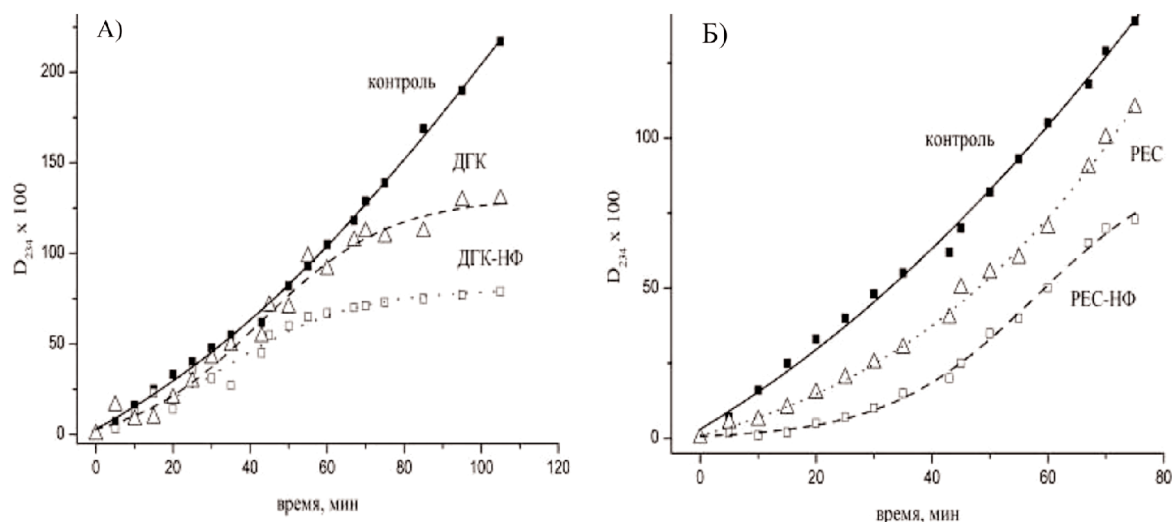
выражали в процентах от содержания продуктов окисления NO у интактных животных.

Влияние включения РЕС в фосфолипидные наночастицы на его эндотелиопротективную активность оценивали путём проведения стандартной пробы на нагрузку сопротивлением (пережатие восходящей аорты на 30 с) [22]. Показателем эндотелиальной дисфункции служило изменение сократимости левого желудочка: выраженное в % отношение сократимости на 25 минуте теста к сократимости на 5 минуте согласно [22].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из подходов при исследовании антиоксидантной/антирадикальной активности является способность исследуемых соединений предотвращать образование гидроперекисей, образующихся при окислении липидов. Начальной стадией окисления липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, является появление диеновых конъюгатов, о которых можно судить по изменению поглощения при 232-234 нм. Для исследования антиоксидантного действия разработанных композиций на основе ДГК и РЕС были выбраны липопротеины низкой плотности (ЛНП) [23]. На рисунке 2 показана динамика образования диеновых конъюгатов при индуцированном ионами меди окислении ЛНП после предварительной инкубации с ДГК или РЕС в свободном виде и в составе фосфолипидных наночастиц. Из рисунка 2 видно, что окисление ЛНП под действием ионов меди в присутствии РЕС и ДГК (как в свободном виде, так в составе фосфолипидных наночастиц), протекало медленнее, чем в контроле. При этом антиоксидантная активность препаратов, содержащих ДГК, была выше, чем для препаратов РЕС: приблизительно одинаковый антиоксидантный эффект оказывали препараты ДГК в 3 раза меньшей концентрации. Эти результаты подтверждают работы других исследователей [24]. Эффективность окисления характеризуют параметром  $\tau_{\text{лаг}}$  – интервалом времени, после которого наблюдается интенсивный рост поглощения  $D_{234}$ . Следует подчеркнуть, что в присутствии субстанций ДГК и РЕС окисление ЛНП происходит быстрее, чем в присутствии их композиций в фосфолипидных наночастицах: значения  $\tau_{\text{лаг}}$  для свободных ДГК и РЕС составляют 6 мин и 14 мин против 9 мин и 29 мин, соответственно.

Таким образом, встраивание ДГК и РЕС в фосфолипидные наночастицы усиливает антиоксидантные свойства этих субстанций, что показано в экспериментах *in vitro* по определению скорости накопления диеновых конъюгатов при окислении ЛНП. В связи с тем, что окисленные ЛНП участвуют в атеросклеротическом изменении стенок сосудов, наблюдаемое усиление антиоксидантных свойств ДГК и РЕС в составе фосфолипидных наночастиц можно рассматривать как увеличение антиатерогенных свойств исследуемых полифенолов [3, 4].

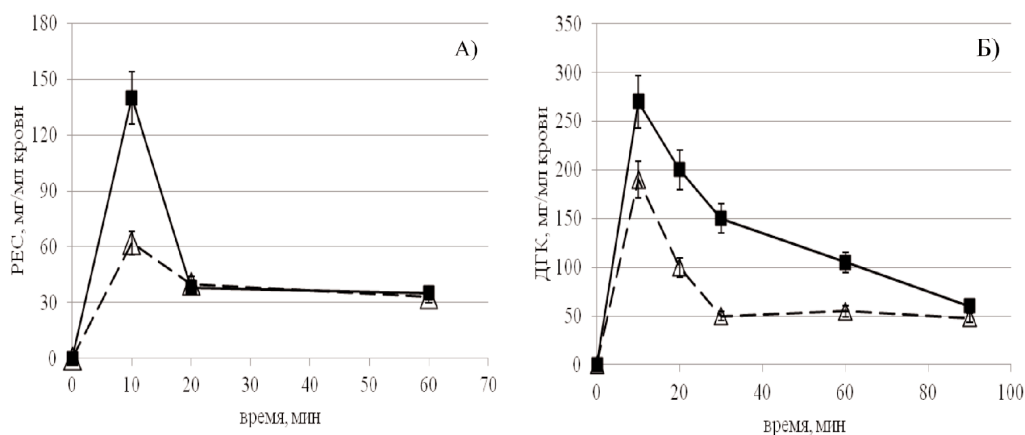


**Рисунок 2.** Кинетика образования диеновых конъюгатов при индуцированном ионами  $\text{Cu}^{2+}$  окислении ЛНП с дигидрокверцетином (А) и ресвератролом (Б) в свободном виде и включёнными в фосфолипидные наночастицы (ДГК-НФ и РЕС-НФ, соответственно). Контроль: ЛНП без антиоксидантов. По оси ординат - изменение оптической плотности при 234 нм по отношению к исходным значениям,  $\times 100$  ( $\Delta D_{234} \times 100$ ).

Проявление биологической активности напрямую связано с биодоступностью биологически активных веществ. Учитывая данные о низкой растворимости в воде РЕС и ДГК [9-12], представляло интерес определить изменение биодоступности этих полифенолов при их встраивании в фосфолипидные наночастицы. Биодоступность полученных композиций РЕС и ДГК определяли в экспериментах на здоровых крысах. Для этого РЕС и ДГК (свободные или в составе фосфолипидных наночастиц) вводили животным перорально с последующим анализом их концентрации в плазме крови в течение 1-1,5 ч [15, 16]. Полученные результаты представлены на рисунке 3. Из этого рисунка видно, что максимальная концентрация в крови РЕС и ДГК ( $C_{\text{макс}}$ ) для препаратов, введенных в виде фосфолипидных композиций, выше таковых при введении в виде свободных субстанций: для РЕС – 140 нг/мл по сравнению с 60 нг/мл,

для ДГК – 260 нг/мл и 190 нг/мл, соответственно. В результате этого площади под кривой “концентрация - время” (area under curve, AUC)  $\text{AUC}_{0-t}$  – фармакокинетический показатель, характеризующий биодоступность, – для обоих веществ увеличивается почти вдвое при включении ДГК и РЕС в фосфолипидную транспортную наносистему в сравнении со свободными субстанциями. Так, величина AUC для РЕС в составе фосфолипидной композиции за время 60 мин составляет 11900 против 6400 нг/мл $\times$ мин для свободного РЕС, а для ДГК ( $\text{AUC}_{0-90\text{мин}}$ ) – 16100 против 7900 нг/мл $\times$ мин, соответственно. Таким образом, включение РЕС и ДГК в фосфолипидные наночастицы размером 20-30 нм практически в два раза повышает их биодоступность.

Двукратное повышение биодоступности для РЕС и ДГК при встраивании в фосфолипидные наночастицы способно оказать влияние



**Рисунок 3.** Изменение содержания ресвератрола (А) и дигидрокверцетина (Б) в плазме крови крыс после однократного перорального введения в составе фосфолипидных наночастиц (квадраты) или в виде свободных субстанций (треугольники). Доза по РЕС - 15 мг/кг, по ДГК - 9 мг/кг).

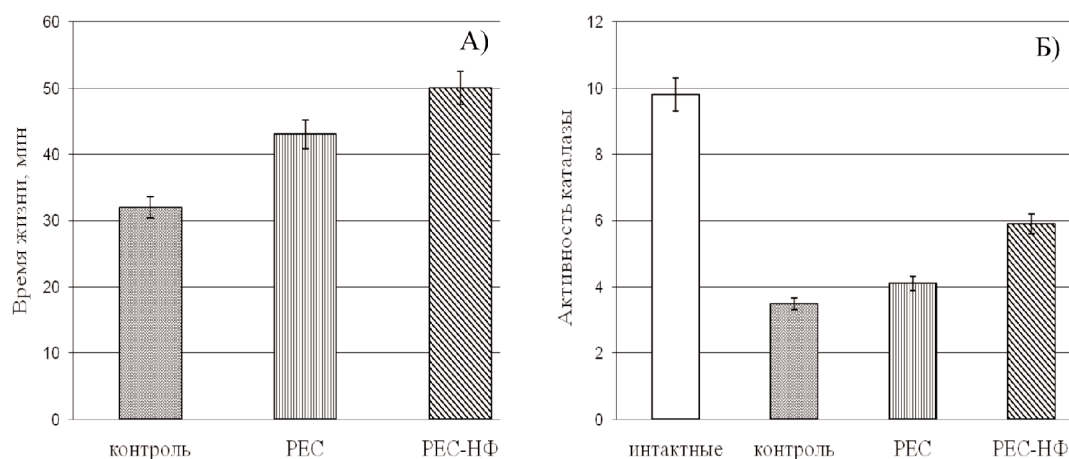


на специфическую активность этих соединений. Для подтверждения этого нами были проведены эксперименты на моделях животных по исследованию антигипоксического и эндотелиопротективного действий РЕС и ДГК.

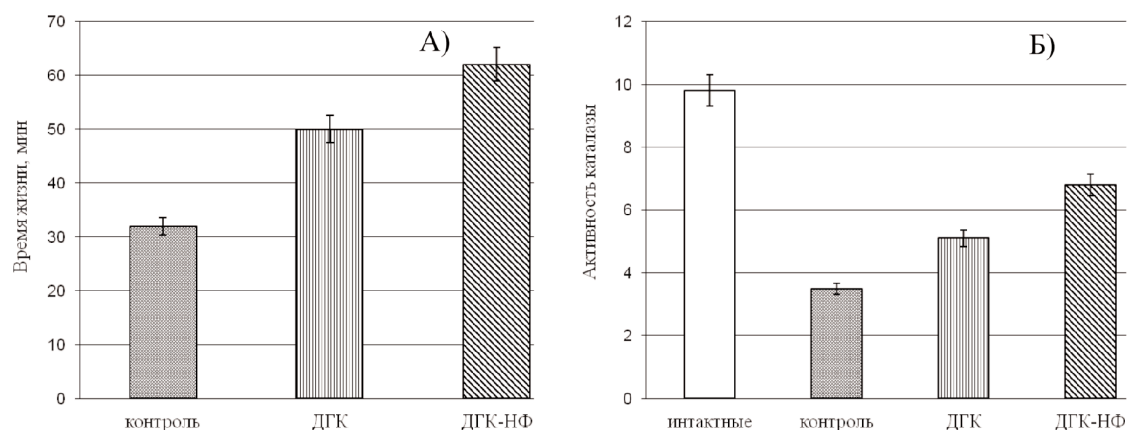
На модели острой гипоксии у мышей была проведена оценка ответа организма животного, получавших препараты РЕС или ДГК, в сравнении с группой контроля. Результаты определения продолжительности выживания животных без доступа кислорода, а также активность каталазы мозга, как показатель уровня защитного ответа на гипоксию [19], приведены на рисунке 4 для РЕС и на рисунке 5 для ДГК.

Как видно из представленных данных, выживаемость в группе животных, получавших в течение 2 недель перед проведением теста РЕС

(рис. 4) и ДГК (рис. 5), в условиях гипоксии увеличилась, а активность каталазы в экстрактах мозга была почти в два раза выше по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует об антигипоксическом действии этих полифенолов [4]. При этом у мышей, получавших РЕС и ДГК в составе фосфолипидных наночастиц, время выживания оказалось почти вдвое больше, чем в контроле, а у получавших свободные РЕС и ДГК увеличение составляло только 30-40% (рис. 4А и 5А). Активность каталазы мозга, резко сниженная при гипоксии (рис. 4Б, контроль), у мышей, получавших свободный РЕС, повышалась незначительно (различия с контролем не достоверны), а после введения РЕС в наночастицах, хотя и не достигала уровня интактных животных, но была на 70% выше, чем в контроле (рис. 4Б).



**Рисунок 4.** Эффективность ресвератрола и его фосфолипидной композиции на модели острой гипоксии у мышей. А - продолжительность выживания животных без доступа кислорода, Б - активность каталазы мозга (мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг×мин); РЕС-НФ - фосфолипидная композиция РЕС. Перед проведением теста экспериментальным животным в течение 15 дней ежедневно перорально вводили свободную субстанцию РЕС и фосфолипидную композицию РЕС-НФ в дозе по РЕС 100 мг/кг.



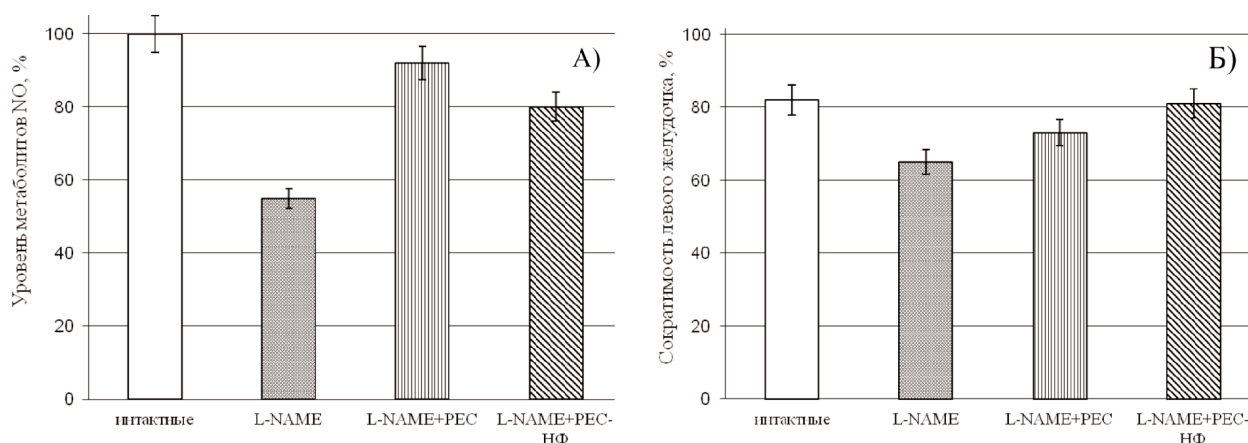
**Рисунок 5.** Эффективность дигидрокверцетина и его фосфолипидной композиции на модели острой гипоксии у мышей. А - продолжительность выживания животных без доступа кислорода, Б - активность каталазы мозга (мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мг×мин); ДГК-НФ - фосфолипидная композиция ДГК. Перед проведением теста экспериментальным животным в течение 15 дней ежедневно перорально вводили свободную субстанцию ДГК и фосфолипидную композицию ДГК. Доза по ДГК - 20 мг/кг.

Для ДГК различия оказались ещё более выраженными, особенно в отношении активности каталазы (рис. 5Б). Активность каталазы после введения ДГК в наночастицах была вдвое выше по сравнению с контролем, в отличие от таковой у животных, получавших свободный ДГК (превышение по отношению к контролю составило 56%). Таким образом, встраивание в фосфолипидные наночастицы практически вдвое повышало эффективность антигипоксического действия обоих полифенолов, что может быть следствием как их большей биодоступности (рис. 3), так и лучшего проникновения в ткани и клетки вследствие возможного попадания в кровь напрямую при всасывании в кишечнике частиц размером 20-30 нм [25].

Существенным фактором, влияющим на способность сосудов противостоять воздействию гипоксии и других отрицательных факторов (например, гемодинамической перегрузке и т.д.), является нормальное функционирование эндотелия [20]. Для этого необходимо снабжение клетки оксидом азота, образующимся из L-аргинина при участии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Снижение активности NOS вызывает эндотелиальную дисфункцию. Известно, что PEC и ДГК активируют реакцию eNOS [4], поэтому представляло интерес выяснить влияние включения PEC и ДГК в фосфолипидные наночастицы на этот процесс. Исследования проводили на крысах с моделью дефицита NO, вызванного введением ингибитора eNOS – L-NAME [20, 21], с параллельным введением препаратов, содержащих PEC. Для оценки степени эндотелиальной дисфункции [22] эффективности PEC оценивали по изменению содержания продуктов окисления NO в крови животных, а также по сократимости левого желудочка (проба на нагрузку сопротивлением, раздел “Методика”). Результаты приведены на рисунке 6.

Из рисунка 6 видно, у животных, получавших L-NAME, концентрация метаболитов NO (нитратов и нитритов) в плазме крови снизилась почти вдвое (рис. 6А). Последующее за L-NAME введение свободного PEC в дозе 2 мг/кг или PEC в составе фосфолипидной наноконпозиции в дозе 0,15 мг/кг (по PEC) практически полностью предотвращало это снижение за счёт свойственного PEC активирующего действия на фермент eNOS [3-5]. При этом PEC в составе фосфолипидных наночастиц проявил более высокую эффективность, так как оказывал практически такое же действие в концентрации на порядок меньшей, чем свободная субстанция PEC.

Аналогичная тенденция наблюдалась при проведении пробы на нагрузку сопротивлением (рис. 6Б). Сократимость левого желудочка (на 25-ой с проведения пробы) у интактных животных составила  $(83,6 \pm 7,7)\%$  от сократимости на 5-ой секунде, принятой за 100% [22], а у животных с индуцируемой L-NAME патологией она снижалась до  $(66,0 \pm 5,5)\%$ , что указывает на выраженную тенденцию к истощению миокардиального резерва [22]. В группе животных, получавших PEC (2 мг/кг), снижение было выражено в меньшей степени – до  $(74,4 \pm 3,0)\%$ . При этом на фоне PEC, вводимого в составе фосфолипидных наночастиц, наблюдалось почти полное предотвращение снижения сократимости левого желудочка при введении по PEC значительно меньших доз (0,15 мг/кг) по сравнению с сохранением этой величины на уровне таковой у интактных животных ( $82,9 \pm 12,2\%$ ). Таким образом, PEC в фосфолипидных наночастицах проявляет существенно большее эндотелиальнопротективное действие, чем свободный PEC (рис. 6Б). Это, по-видимому, является следствием его более эффективного активирующего действия на активность eNOS, так как основным механизмом, лежащим в основе эндотелиальной дисфункции в данной



**Рисунок 6.** Действие ресвератрола в свободном виде и в составе фосфолипидных наночастиц у крыс с моделью дефицита NO, индуцированного введением метилового эфира нитро-L-аргинина (L-NAME). А - содержание метаболитов NO в плазме крови, Б - сократимость левого желудочка в пробе на нагрузку сопротивлением; PEC-НФ - фосфолипидная композиция PEC. В течение 7 дней однократно вводили внутрибрюшинно L-NAME 25 мг/кг и через 30 мин внутрижелудочно вводили свободную субстанцию PEC (2 мг/кг), или PEC в составе фосфолипидной наноконпозиции (по PEC 0,15 мг/кг).

модели (при введении L-NAME), является снижение образования NO [26].

Следует отметить, что хотя биодоступность PEC, введенного перорально в составе фосфолипидных наночастиц в два раза выше, чем PEC, введенного в свободном виде, одинаковое NO-стимулирующее действие фосфолипидной композиции PEC проявляется в дозе по PEC почти в 20 раз ниже. Такой эффект можно объяснить тем, что по данным Florence [25], частицы диаметром менее 50 нм, и, следовательно, частицы фосфолипидной композиции размером менее 30 нм могут попадать непосредственно в кровь и за счёт большего сродства к мембранам клеток [27] повышать интернализацию PEC, а, следовательно, и транспорт к мишеням в клетках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В экспериментах *in vitro* на примере окисления ЛНП ионами меди показано, что в составе фосфолипидных композиций PEC и ДГК обладают большей антиоксидантной способностью. Исследования биологической активности PEC и ДГК в экспериментах на животных показали, что их биодоступность при пероральном введении в составе фосфолипидных наночастиц в два раза выше в сравнении со свободными полифенолами. Это сказывается на проявлении биологической активности. В условиях острой гипоксии активность каталазы экстрактов головного мозга животных, получавших ежедневно фосфолипидные композиции PEC и ДГК, была существенно выше, чем в контроле и в группе животных, получавших PEC и ДГК в свободном виде. При этом также повышалась выживаемость животных. Важно отметить, что на фоне ДГК и PEC возрастала способность эндотелиальных клеток противостоять нарушению их функционирования на модели дефицита окиси азота у крыс. При этом одинаковый эффект наблюдали для фосфолипидной композиции полифенола при дозе по PEC более чем на порядок меньшей, чем при введении свободного PEC. Таким образом, профилактические свойства полифенолов в составе фосфолипидных наночастиц существенно выше, чем для их свободных аналогов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. (2008) *Mol. Cell Biochem.*, **314**(1-2), 65-71.
2. Vang O., Ahmad N., Baile C.A., Baur J.A., Brown K., Criszar A., Das D.K., Delmas D., Gottfried C., Lin H.Y., Ma O.Y., Mukhopadhyay P., Nalini J.M. et al. (2011) *PLoS One*, **6**(6), e18881, 1-11.
3. Weidmann A.E. (2012) *Eur. J. Pharmacol.*, **684**(1-3), 19-26.
4. Kulkarni S.S., Cantó C. (2014) *Biochim Biophys Acta*, Oct 11, pii: S0925-4439(14)00311-1 [Epub ahead of print].
5. Yamagata K., Tagami M., Yamori Y. (2015) *Nutrition*, **31**(1), 28-37.
6. Nakata R., Takahashi S., Inoue H. (2012) *Biol. Pharm. Bull.*, **35**(3), 273-279.
7. Emura K., Yokomizo A., Tavoshi T., Moriwaki M. (2007) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**(1), 68-74.
8. Potenza M.A., Marasciulo F.L., Tarquinio M., Tiravanti E., Colantuono G., Federici A., Kim J.A., Quon M.J., Montagnani M. (2007) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **292**(5), E1378-13287.
9. Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Сариев А.К., Виглинская А.О., Геккиев Б.И., Григорьев А.М., Горлов В.В. (2010) *Эксп. клин. фармакол.*, **73**(1), 23-25.
10. Smoliga J.M., Blanchard O. (2014) *Molecules*, **19**(11), 17154-17172.
11. Наумов А.А., Поцелуева М.М. (2010) *Цитология*, **52**(4), 311-316.
12. Cadena P.G., Pereira M.A., Cordeiro R.B., Cavalcanti I.M., Barros Neto B., Pimentel M.C., Lima Filho J.L., Silva V.L., Santos-Magalhães N.S. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**(2), 309-316.
13. Neves A.R., Lucio M., Lima J.L., Reis S. (2012) *Curr. Med. Chem.*, **19**(11), 1663-1668.
14. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Иванова Н.Д., Широнин А.В., Баранова В.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 101-119.
15. Широнин А.В., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Захарова Т.С., Санжаков М.А., Торховская Т.И. (2011) *Биомед. химия*, **57**, 671-676.
16. Прозоровская Н.Н., Баранова В.С., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Гусева Д.А., Арчаков А.И. (2009) Оздоровительно-профилактическая композиция, включающая комбинации соевого фосфолипидного комплекса и экстрактов лекарственных растений и биологически активная добавка на основе этой композиции. Патент РФ № 2252029.
17. Seidel D., Alaupovic P., Furman R.H., McConathy W.J. (1970) *J. Clin. Invest.*, **49**(12), 2396-2407.
18. Семизоловский Н.Ю., Колбасов С.Ю., Лисицын Д.В., Фазылов М.Ф. (2008) *Вестник СПб университета*, Сер. 11 (Медицина), Приложение, 41-46.
19. Rauchová H., Vokurková M., Koudelová J. (2012) *Physiol. Res.*, **61**, Suppl. 1, S89-101.
20. Kataoka C., Egashira K., Inoue S., Takemoto M., Ni W., Koyanagi M., Kitamoto S., Usui M., Kaibuchi K., Shimokawa H., Takeshita A. (2002) *Hypertension*, **39**(2), 245-250.
21. Корокин М.В., Корокина Л.В., Граник В.Г., Макаров В.А. (2006) *Биомедицина*, **4**, 90-92.
22. Артюшкова Е.Б. (2009) Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции препаратами с различными механизмами действия. Дисс. докт. наук, ВНИЦ БАН, Старая Купавна.
23. Tikhonov I., Rodinsky V., Pliss E. (2009) *Int. J. Chem. Kinet.*, **41**, 92-100.
24. Joo S.J., Park H.J., Park J.H., Cho J.G., Kang J.H., Jeong T.S., Kang H.C., Lee D.Y., Kim H.S., Byun S.Y., Baek N.I. (2014) *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(9), 16418-16429.
25. Florence A.T. (2004) *J. Drug Target.*, **12**(2), 65-70.
26. Марков Х.М. (2006) Патол. физиол. эксперимент. тер., **3**, 2-7.
27. Mussi S.V., Silva R.C., Oliveira M.C., Lucci C.M., Azevedo R.B., Ferreira L.A. (2013) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **48**(1-2), 282-290.

Поступила: 25. 04. 2015.

INFLUENCE OF RESVERATROL AND DIHYDROQUERCETIN INCLUSION INTO PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES ON THEIR BIOAVAILABILITY AND SPECIFIC ACTIVITY

*D.A. Guseva<sup>1</sup>, Yu.Yu. Khudoklina<sup>2</sup>, N.V. Medvedeva<sup>3</sup>, V.S. Baranova<sup>3</sup>, T.S. Zakharova<sup>3</sup>,  
E.B. Artyushkova<sup>4</sup>, T.I. Torkhovskaya<sup>3</sup>, O.M. Ipatova<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Moscow State University of Technologies and Management, Moscow, Russia

<sup>2</sup>IBMC - EcoBioPharm LLC, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: 8-499-248-40-08 ; e-mail: torti@mail.ru

<sup>4</sup>Kursk State Medical University, Kursk, Russia

The effects of natural polyphenols, resveratrol (RES) and dihydroquercetin (DHQ), included in phospholipid nanoparticles, have been compared with free substances of RES and DHQ in *in vitro* and *in vivo* experiments.

Preincubation of healthy donor plasma low density lipoproteins (LDL) with RES or DHQ included in phospholipid nanoparticles caused a more pronounced decrease in Cu<sup>2+</sup> induced lipid oxidation compared with the free substances, and reduced the formation of lipid peroxides products. Bioavailabilities of RES and DHQ in phospholipid formulations after oral administration in rats were increased by 1.5-2 times. In an acute hypoxia model in mice prophylactic two-week administration of RES or DHQ phospholipid formulations resulted in 25% increase in survival and 1.5-fold increase in catalase activity in brain homogenates compared to free substances.

Using the model of endothelial dysfunction in rats induced by L-NAME it was shown, that RES markedly attenuated the inhibition effect of L-NAME on NO synthesis. RES in phospholipid nanoparticles had the same action at a dose 10 times lower compared to free RES. Load test with resistance (clamping of the ascending aorta for 30 sec) showed that phospholipid formulation of RES possessed more pronounced protective effect due to the stimulation of endothelial NO-synthase.

**Key words:** resveratrol, dihydroquercetin, phospholipids nanoparticles, bioavailability, hypoxia, endothelial dysfunction