

СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ БИОПОЛИМЕРНОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМБИНАЦИИ НУТРИЦЕВТИКОВ

© 2024 г. М. Г. Семёнова*, А. С. Антипова, Е. И. Мартиросова,
М. С. Анохина, Д. В. Зеликина, Н. Г. Богданова, Н. П. Пальмина

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: mariagersem@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

На основе фосфатидилхолина сои (ФХ) была получена липосомальная форма комбинации гидрофобных нутрицевтиков (омега-3 докозагексаеновой полиненасыщенной жирной кислоты (ДГК) и одного из наиболее активных растительных антиоксидантов, а именно эфирного масла гвоздики (ЭМГ)). С помощью ЭПР-спектроскопии изучено влияние ДГК и ЭМГ на микровязкость бислоя липосом ФХ. Кроме того, по данным дифференциально-сканирующей калориметрии установлено влияние ДГК и ЭМГ на фазовое состояние бислоя модельных липосом дипальмитоилфосфатидилхолина. Комбинацией методов ЭПР-спектроскопии, дифференциально-сканирующей калориметрии, а также лазерного светорассеяния изучено, каким образом инкапсулирование липосом ФХ-ДГК-ЭМГ ковалентным коньюгатом (К) казеината натрия и мальтодекстролина влияет как на структурное состояние бислоя, инкапсулированных липосом, так и на структурные (молярная масса, размер, плотность, архитектура, дзета-потенциал) и термодинамические параметры (осмотический второй вириальный коэффициент) сформировавшегося между ними водорастворимого супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. Установлены ключевые структурные параметры этого комплекса, обеспечивающие эффективную защиту ПНЖК, входящих в его состав, от окисления кислородом воздуха.

Ключевые слова: липосомы, биополимеры, нутрицевтики, структура, термодинамические параметры, супрамолекулярный комплекс, система доставки.

DOI: 10.31857/S0207401X24110084

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнано, что дефицит в организме человека ряда биологически активных веществ, так называемых нутрицевтиков (веществ, обладающих, как питательной, так и фармацевтической ценностью), может приводить к развитию различных хронических неинфекционных заболеваний (сахарный диабет 2-го типа, онкология, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания) [1, 2]. Установлено, что обогащение пищевых продуктов низкомолекулярными нутрицевтиками (антиоксидантами (эфирные масла, каротиноиды и др.), фосфолипидами, незаменимыми полиненасыщенными жирными кислотами (омега-3 и омега-6 ПНЖК в их оптимальном соотношении 1 : 1 ÷ 4 : 1), витаминами (Д, В, С и др.)), является эффективной стратегией

в противодействии дефициту биологически активных веществ [3, 4]. Однако сохранение структуры нутрицевтиков и, соответственно, их биологической активности остается проблемой на практике. Для решения этой проблемы разрабатываются различные по своей природе пероральные системы доставки нутрицевтиков (микреллы, липосомы, полимерные наночастицы и эмульсии) [5, 6].

Хорошо известно, что уникальная структура липосом позволяет широко использовать их для инкапсулирования и в качестве средства доставки различных активных фармацевтических ингредиентов [7], однако их применение для инкапсулирования нутрицевтиков еще недостаточно хорошо изучено. Среди липосом фосфолипидов липосомы фосфатидилхолина (ФХ) являются

одними из наиболее перспективных и полезных для здоровья природных наноразмерных систем доставки как гидрофобных, так и гидрофильных нутрицевтиков. Такая липосомальная форма нутрицевтиков обладает рядом преимуществ перед другими системами доставки. Так, сходство бислоя ΦX с клеточной мембраной может облегчить биоусвоение нутрицевтиков в клетках пищеварительного тракта [8]. Кроме этого, биоусвоению нутрицевтиков может содействовать способность липосом ΦX формировать смешанные мицеллы с желчными солями в тонком кишечнике. И в дополнении к этому ΦX является хорошо известным гепатопротектором [9]. Однако, наряду с этими преимуществами, липосомы ΦX имеют ряд недостатков. Это – нестабильность структуры липосом и связанное с этим, неконтролируемое высвобождение из них загруженных нутрицевтиков, а также склонность липосом ΦX , изначально содержащих ПНЖК, к автоокислению кислородом воздуха, особенно при повышенных температурах пищевых производств и при хранении.

В настоящее время хорошо известно, что природные биосовместимые полимеры могут улучшить растворимость лекарственных веществ и повысить их пероральную биодоступность [10, 11]. При этом в случае разработки пероральных систем доставки липосомальных форм нутрицевтиков большой интерес вызывают ковалентные коньюгаты пищевых белков и полисахаридов, полученные объединением аминогрупп белка с восстанавливающими карбонильными концевыми группами полисахаридов на первой стадии реакции Майара (Maillard). Основными преимуществами ковалентных коньюгатов, полученных по реакции Майара, являются их растворимость и стабильность в широких диапазонах pH и ионной силы, включая изоэлектрическую точку белков [12], а также контролируемый ферментативный гидролиз в пищеварительном тракте, задаваемый как природами белка и полисахарида, так и их молярным соотношением в коньюгате [13]. Эти свойства ковалентных коньюгатов могут быть важны при инкапсулировании и защите нутрицевтиков в экстремальных условиях пищевых производств и при хранении, а также для их контролируемого высвобождения и биодоступности в различных условиях окружающей среды пищеварительного тракта (специфические ферменты,

pH и ионная сила в ротовой полости, желудке и тонком кишечнике).

Таким образом, целью нашей работы было выяснение физико-химических закономерностей, лежащих в основе формирования структуры, и свойств системы доставки на основе ковалентного коньюгата казеината натрия (Каз-На) и мальтодекстрин (МД) для липосомальной формы фосфатидилхолина (ΦX), обогащенной комбинацией гидрофобных нутрицевтиков, а именно омега-3 ПНЖК (докозагексаеновой жирной кислотой, ДГК) и наиболее эффективным растительным антиоксидантом (эфирным маслом гвоздики, ЭМГ [14]) в их адекватных для оздоровительного эффекта количестве и соотношении [15].

Для достижения этой цели необходимо было решить ряд задач. Используя ЭПР-спектроскопию, а также дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) ставилась задача изучить влияние встраивания выбранных гидрофобных нутрицевтиков (ДГК, ЭМГ), а также инкапсулирования липосом коньюгатом Каз-На-МД (К), на структурное состояние бислоя липосом, сформированных в водной среде. Проводя измерения методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретических режимах ставилась задача охарактеризовать структурные (размер, молярная масса, архитектура, заряд, плотность), а также термодинамические (осмотический второй вириальный коэффициент) параметры супрамолекулярных комплексов ΦX -ДГК-ЭМГ-К в водной среде. На основании полученных данных требовалось выяснить основные взаимосвязи между структурными/термодинамическими параметрами супрамолекулярного комплекса ΦX -ДГК-ЭМГ-К и его функциональностью, а именно растворимостью в водной среде и защитными способностями по отношению к автоокислению кислородом воздуха включенных в его состав эссенциальных ПНЖК.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

Были использованы: соевый фосфатидилхолин (ΦX) 98%-ной химической чистоты (марка Lipoid S 100) производства фирмы “Lipoid GmbH” (Германия) – состав основных жирных кислот ΦX представлен ранее в работе [16]; докозагексаеновая полиненасыщенная жирная кислота (ДГК) ³

98%-ной химической чистоты (D2534, "Sigma-Aldrich", США); синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) 99%-ной химической чистоты (P-5911, "Sigma-Aldrich", США); ковалентный конъюгат казеината натрия (Каз-На) (C8654, Sigma-Aldrich, Новая Зеландия) и мальтодекстрина (МД) марки Paselli SA2 с декстрозным эквивалентом равным 2 ("Avebe Group", Нидерланды), был приготовлен при весовом соотношении белок : мальтодекстрин = 1 : 2 по методике, описанной ранее [6]; эфирное масло из бутонов цветов гвоздичного (ЭМГ) дерева (*Eugenia caryophyllata* Thumb, "Plant Lipids Ltd.", Индия); 16-доксистеариновая кислота (16-ДСК, 810604Р, "Avanti Polar Lipids", США); NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , HCl , NaOH , NaN_3 , трихлоруксусная кислота (ТХУ), тиобарбитуровая кислота (ТБК), диэтиловый эфир ("Баум-Люкс", Россия) имели высокую степень химической чистоты (> 99%), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – 95%. Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде. Азид натрия ($2 \cdot 10^{-4}$ г/мл) добавлялся к буферу в качестве антимикробного агента.

2.2. Методы

Липосомы ФХ ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл) и ДПФХ ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл), нагруженные докозагексаеновой кислотой ($0.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл) при отсутствии и в присутствии ($0.06 \cdot 10^{-3}$ г/мл) ЭМГ, получали по методике, включающей несколько последовательных стадий. На первой стадии необходимые количества ФХ/ДПФХ и ДГК растворяли в этаноле. При этом в случае липосом ФХ-ДГК и ФХ-ДГК-ЭМГ достигалось равное весовое соотношение омега-3 к омега-6 ПНЖК. Затем к полученному раствору добавляли фосфатный буфер (рН 7.0, $I = 0.001\text{M}$) до 50%-ной объемной концентрации спирта в водной среде. Для экспериментов, в которых не изучалась защита от окисления, пропускали через полученную дисперсию инертный газ аргон в течение 1 мин. Далее проводили механическую гомогенизацию этой дисперсии при 20000 об/мин, 2 мин ("Heidolph", Германия). В процессе гомогенизации при необходимости добавляли спиртовой раствор ЭМГ.

На следующей стадии полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком (гомогенизатор VCX-130, "Sonics & Materials", США) три раза по 5 мин (40%-ная мощность сигнала в режиме: 30 с обработки – 30 с перерыв). При обработке ультразву-

ком образец находился во льду. Затем полученную дисперсию пропускали 19 раз через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экспрессор ("Avanti Polar Lipid", США).

Для удаления этанола из полученных дисперсий ФХ/ДПФХ использовали равновесный диализ против фосфатного буфера (рН = 7.0, $I = 0.001\text{M}$), гидромодуль составлял 20, продолжительность диализа – 24 ч. Предварительная оценка показала, что липосомы ФХ/ДПФХ не проникали через поры используемого диализного шланга (Visking Dialysis Tubing, тип 36/32, "Serva Electrophoresis", Германия). Остаточное количество этанола в растворах ФХ/ДПФХ составляло 0.5 об./об.%. При приготовлении липосом для измерения методом ЭПР использовали гидромодуль 50, остаточное количество этанола в растворах ФХ составляло 0.007 об./об.%. Для экспериментов, в которых не изучалась защита от окисления, липосомы хранили в среде Ar в холодильнике (2–8 °C).

Самопроизвольные образования супрамолекулярных комплексов конъюгата Каз-На–МД (К) с липосомами формировались (40 °C, 1 ч) при смешении растворов конъюгата и липосом в термостатируемом шейкере (GFL 3032, Германия). Весовое соотношение липосомы : конъюгат = 1 : 10. Ранее было показано, что данное соотношение обеспечивало высокие защитные свойства конъюгата по отношению к автоокислению липосом ФХ, обогащенных триглицеридами льняного масла, содержащими 55% α -линовеновой и 19% линолевой ПНЖК [6].

Измерение термодинамических параметров и функций фазового перехода в бислойе липосом проводили на модельном дипальмитоилфосфатидилхолине с использованием метода ДСК на микрокалориметре ДАСМ-4М (Пущино, Россия). Измерения проводили при постоянном давлении в 2.5 атм в температурном диапазоне от 20 до 50 °C. Скорость нагрева соответствовала 0.5 °C/мин для всех измерений. Концентрация в образцах составляла ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл) ДПФХ. Чувствительность калориметрического измерения составляла не менее $5 \cdot 10^{-6}$ Дж/с. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, трех независимых измерений.

Многоугловое лазерное (633 нм, Не–Не лазер) светорассеяние в статическом и динамическом

режимах (ЛС-01, ЗАО “Научные приборы” Санкт-Петербург, Россия) использовали для определения как структурных параметров (гидродинамического радиуса, R_h ; радиуса инерции, R_G ; структурно-чувствительного параметра, характеризующего форму частиц, $\rho = R_G/R_h$; средневесовой молярной массы, M_w ; плотности, $d = M_w/(N_A V)$), так и термодинамического параметра – осмотического второго вириального коэффициента, A_2 , характеризующего термодинамическое сродство частиц комплекса к растворителю [6]. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением экспериментальных величин, полученных в статическом режиме при экстраполяции, выполненной по 13 углам рассеяния в диапазоне 40–140° и как минимум по семи значениям концентрации. В динамическом режиме измерений усреднение проводили, как минимум, по десяти независимым измерениям.

Данные, полученные методом дифференциальной рефрактометрии (633 нм, “Shimadzu”, Япония) использовали для определения инкрементов показателей преломления, dn/dc , изучаемого коньюгата Каз-На–МД и его комплексов с липосомами, $dn/dc = 0.17 \cdot 10^{-3} \pm 0.01 \text{ м}^3/\text{кг}$.

Метод электрофоретического лазерного рассеяния света (633 нм, Не–Не-лазер, двухугловой анализатор размера частиц и молекул Zeta sizer Nano ZS, “Malvern”, Великобритания) использовали для измерения дзета-потенциала. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, пяти независимых измерений.

Структурное состояние бислоя изучаемых липосом как свободных, так и инкапсулированных коньюгатом, оценивали с помощью спектрскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Спектры ЭПР были получены в присутствии спинового зонда (16-доксилстеариновой кислоты) при температуре 20 °C на спектрометре EMX (Bruker, Германия). Каждующаяся микровязкость глубоколежащих областей бислоя (20–22 Å) липосом характеризовали временем вращательной корреляции (τ_C) зонда 16-ДСК, которое рассчитывалось по формуле для быстрого анизотропного вращения радикала [17]. Молярное соотношение 16-ДСК и ФХ составляло 1:1000. Концентрация ФХ поддерживалась постоянной и равной 1.56 мг/мл. Концентрации других компонентов липосом составляли: 0.875 для ДГК, 0.1 для ЭМГ

и 10 мг/мл для коньюгата (Каз-На–МД). Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, десяти независимых измерений.

Метод спектрофотометрии (спектрофотометр СФ-2000, “Спектр”, Россия) был использован для оценки как степени инкапсулирования липосом коньюгатом Каз-На–МД по величине абсорбции свободными липосомами, измеренной при длине волны $\lambda = 215$ нм в их экстракте диэтиловым эфиром из водных растворов, так и вторичного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) по реакции с ТБК в присутствии ТХУ.

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA) и Origin Pro 8.1 (OriginLab, USA). Для определения статистических различий проводился однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с Тьюки (Tukey)-тестом. Статистическая значимость различий между сравниваемыми группами устанавливалась на уровне $p < 0.05$.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Структурные и термодинамические параметры супрамолекулярных комплексов

В первую очередь необходимо отметить, что степень инкапсулирования всех видов изученных липосом коньюгатом Каз-На–МД составляла $\geq 95\%$. Общую структуру супрамолекулярных комплексов и их термодинамическое сродство к водной среде характеризовали методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретических режимах. В табл. 1 представлены измеренные значения структурных и термодинамических параметров образующихся супрамолекулярных комплексов коньюгата Каз-На–МД с липосомами (ФХ-ДГК) при отсутствии и в присутствии ЭМГ.

Величина структурно-чувствительного параметра ρ , лежащая в пределах ошибки измерений в диапазоне от 1 до 2, указывает на то, что супрамолекулярные частицы, так же как и исходный коньюгат, имели сферическую архитектуру [18]. Сопоставление средневесовых молярных масс комплексов и исходного коньюгата Каз-На–МД свидетельствует о значительной ассоциации исходных частиц коньюгата в результате инкапсу-

Таблица 1. Значения структурных и термодинамических параметров ковалентного коньюгата Каз-На-МД (К), а также его комплексов с липосомами ФХ-ДГК при отсутствии и в присутствии эфирного масла гвоздики (pH = 7.0, I = 0.001 M, 25 °C)

Образец	$M_w \cdot 10^{-6}$, Да	R_G , нм	$\rho = R_G / R_h$	d , мг/см ³	A_2 , м ³ /моль	ζ -потенциал, мВ
Каз-На-МД (К)	$6.0 \pm 0.8^{\delta}$	$125 \pm 6^{\delta}$	$1.75 \pm 0.09^{\alpha}$	$1.20 \pm 0.12^{\delta}$	$2.74 \pm 0.40^{\delta}$	$-23.0 \pm 1.2^{\delta}$
ФХ-ДГК-К	$101 \pm 13^{\alpha}$	$290 \pm 15^{\alpha}$	$2.10 \pm 0.11^{\alpha}$	$1.63 \pm 0.20^{\delta}$	$123.8 \pm 18.6^{\alpha}$	$-42.76 \pm 2.14^{\alpha}$
ФХ-ДГК-ЭМГ-К	$120 \pm 15^{\alpha}$	$212 \pm 11^{\delta}$	$1.95 \pm 0.10^{\alpha}$	$5.19 \pm 0.65^{\alpha}$	$73.7 \pm 11.1^{\delta}$	$-34.68 \pm 1.73^{\delta}$

Примечание. Индексы “ α ”–“ δ ” указывают на статистически значимые различия (при $p < 0.05$) между сравниваемыми в одном столбце величинами измеренных параметров.

лирования липосом. При этом коэффициент ассоциации ($k_{Mw} = M_w^{\text{комплекса}} / M_w^{\text{коньюгата}}$) достигал величины ~ 17 для комплекса ФХ-ДГК-К и ~ 20 – для комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. При этом, радиус инерции, R_G , комплексов сохранялся, как и у коньюгата, на субмикронном уровне. В то же время коэффициент увеличения размера частиц в результате этой ассоциации ($k_{RG} = R_G^{\text{комплекс}} / R_G^{\text{коньюгат}}$) был практически на порядок ниже, чем k_{Mw} . А именно, $k_{RG} \approx 2.3$ для комплекса ФХ-ДГК-К и $k_{RG} \approx 1.7$ для комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. В результате наблюдаемая ассоциация приводила к возрастанию плотности (d) комплексных частиц, величина которой достигала практически четырехкратного увеличения по сравнению с плотностью частиц коньюгата в случае присутствия ЭМГ в липосомах.

На основании этих данных можно предположить, что липосомы играли роль эффективных как межмолекулярных, так и внутримолекулярных “сшивающих” агентов, особенно в присутствии ЭМГ. Функция ЭМГ, как “сшивающего” агента белковых макромолекул, подтверждается литературными данными [6]. При этом сравнение величин ζ -потенциала исходного коньюгата и комплексов (табл. 1) с величиной ζ -потенциала соответствующих липосом – (-63.2 ± 3.2) мВ для ФХ-ДГК и (-63.3 ± 3.2) мВ для ФХ-ДГК-ЭМГ, указывает на значительное снижение ζ -потенциала липосом при их инкапсулировании коньюгатом Каз-На-МД. На основании этого можно предположить, что электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами белка и липидов (ФХ и ДГК) вносят существенный вклад в формирование изучаемых супрамолекулярных комплексов. При этом важно отметить, что величина ζ -потенциала комплексов, превышающая 30 мВ, обеспечивала им высокий уровень растворимости

и коллоидной стабильности в водной среде. Это хорошо согласовывалось с высокими положительными значениями осмотического второго вириального коэффициента в разложении химических потенциалов растворителя и комплексов по концентрации, характеризуя высокое термодинамическое сродство комплексов к водной среде.

3.2. Структурное состояние бислоя липосом

Для оценки структурного состояния бислоя липосом ФХ в супрамолекулярных комплексах использовали метод ЭПР-спектроскопии. В табл. 2 представлены данные о влиянии введения ДГК и ЭМГ, а также инкапсулирования липосом коньюгатом Каз-На-МД, на время вращательной корреляции в двух перпендикулярных направлениях (τ_{c1}, τ_{c2}) спинового зонда 16-ДСК в глубоколежащих областях (20–22 Å) бислоя липосом ФХ. Введение ДГК статистически достоверно снижало время вращательной корреляции зонда 16-ДСК, свидетельствуя об уменьшении микровязкости бислоя ФХ, находящегося в жидкокристаллическом состоянии. Этот результат был обусловлен нарушением упорядоченности бислоя за счет встраивания в него изогнутых полиненасыщенных

Таблица 2. Влияние ДГК, ЭМГ и коньюгата (Каз-На – МД) на время вращательной корреляции спинового зонда 16-ДСК в глубоколежащих областях (20–22 Å) бислоев липосом ФХ, в водной среде (pH = 7.0, фосфатный буфер, I = 0.001M)

Образец	$\tau_{c1} \cdot 10^{10}$, с ⁻¹	$\tau_{c2} \cdot 10^{10}$, с ⁻¹
ФХ	$9.60 \pm 0.15^{\delta}$	$9.5 \pm 0.1^{\delta}$
ФХ-ДГК	$9.2 \pm 0.1^{\delta}$	$9.1 \pm 0.1^{\delta}$
ФХ-ДГК-ЭМГ	$9.2 \pm 0.1^{\delta}$	$9.0 \pm 0.3^{\delta}$
ФХ-ДГК-К	$18.7 \pm 0.4^{\alpha}$	$15.90 \pm 0.05^{\alpha}$
ФХ-ДГК-ЭМГ-К	$18.2 \pm 0.6^{\alpha}$	$15.0 \pm 0.5^{\delta}$

Индексы “ α ”–“ δ ” указывают на статистически значимые различия (при $p < 0.05$) между сравниваемыми в одном столбце величинами измеренных параметров.

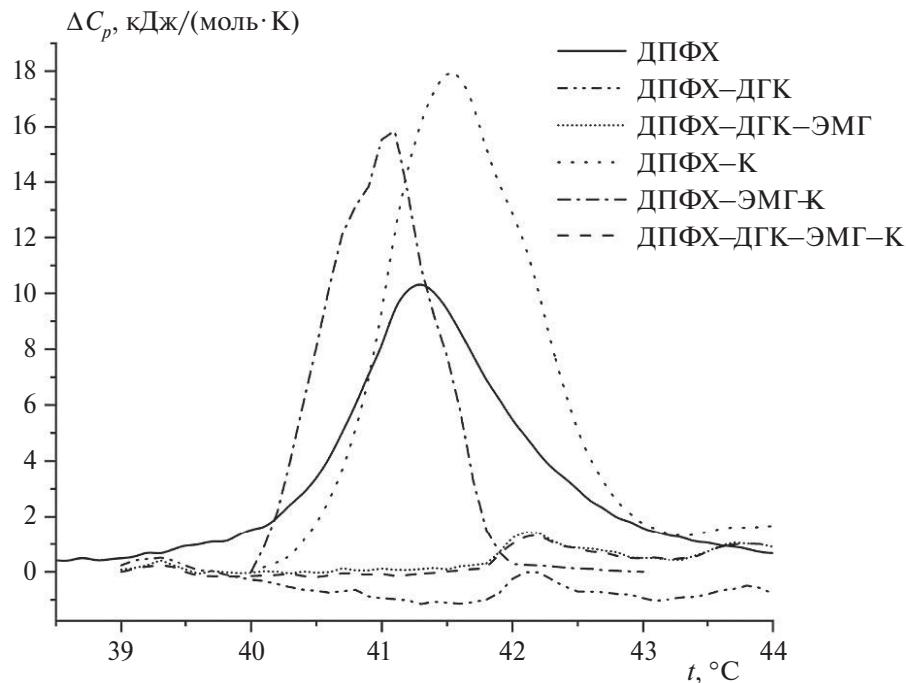


Рис. 1. Термограммы фазового перехода бислоя липосом ДПФХ ($0.5 \cdot 10^{-3}$ М) из гелеподобного в жидкокристаллическое состояние в присутствии ДГК, ЭМГ и в результате инкапсулирования коньюгатом (Каз-На-МД); $\text{pH} = 7.0$, $I = 0.001$ М.

углеводородных цепочек ДГК [19]. Добавление ЭМГ, состоящего на 72% из небольших молекул эвгенола, в изученной концентрации не изменяло время вращательной корреляции зонда 16-ДСК.

В то же время инкапсулирование липосом коньюгатом приводило к ярко выраженному возрастанию времен вращательной корреляции зонда 16-ДСК, указывая на значительное увеличение микровязкости в глубоколежащих областях (20–22 Å) бислоя липосом ФХ. Такое влияние коньюгата, очевидно, было связано со встраиванием гидрофобных участков белка в бислой, приводя к его уплотнению [20].

Дополнительная информация о влиянии введения ДГК, ЭМГ и инкапсулирования коньюгатом Каз-На-МД на структурное состояние бислоя липосом была получена на липосомах модельного дипальмитоилфосфатидилхолина методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Из рис. 1 видно, что на термограмме, полученной для липосом ДПФХ, при температуре $t = (41.3 \pm 0.1)$ °С наблюдается фазовый переход (ФП) бислоя из гелеподобного фазового состояния в жидкокристаллическое. Этот переход характеризуется величиной энталпии $\Delta H_{\text{ФП}} = (17.4 \pm 1.6)$ кДж/моль. Инкапсулирование липосом ДПФХ коньюгатом приводило к небольшому сдвигу температуры ФП,

(41.5 ± 0.1) °С, и статистически значимому возрастанию энталпии, (25.2 ± 2.3) кДж/моль. По-видимому, этот результат подтверждает данные ЭПР-спектроскопии, предполагающей встраивание гидрофобных участков белка в бислой липо-

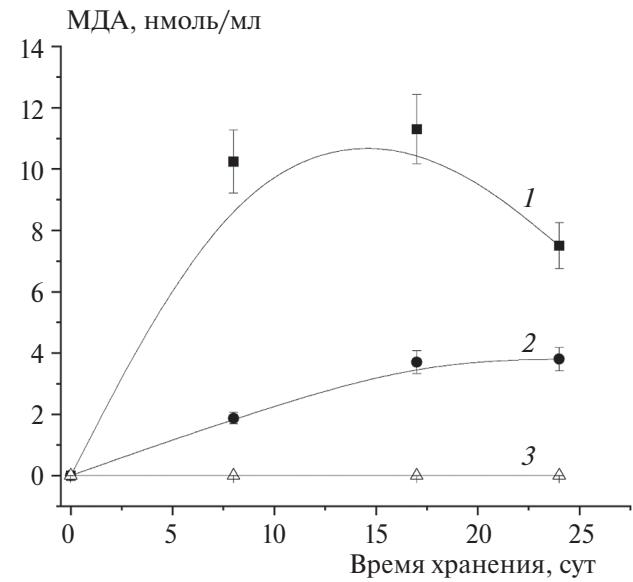


Рис. 2. Накопление вторичного продукта перекисного окисления ПНЖК (МДА) в водных растворах липосом ФХ-ДГК (1), ФХ-ДГК-ЭМГ (2) и супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К (3) при их хранении в течение 24 сут при комнатной температуре (20–22 °С) на свету ($\text{pH} = 7.0$, $I = 0.001$ М).

сом ДПФХ. При этом увеличение $\Delta H_{\text{ФП}}$ могло свидетельствовать как о формировании новых гидрофобных связей между гидрофобными функциональными группами белка и углеводородными цепочками жирных кислот в бислой ДПФХ, так и о возрастании энергии гидрофобного притяжения между углеводородными цепочками жирных кислот ДПФХ, формирующих бислой.

В присутствии ЭМГ в бислой ДПФХ встраивание гидрофобных участков белка, входящего в состав конъюгата, приводило к не столь выраженному возрастанию энталпии ФП, (21.3 ± 1.9) кДж/моль, и снижению температуры ФП, (41.1 ± 0.1) °С. По-видимому, в присутствии ЭМГ меньшее число гидрофобных взаимодействий белок–ДПФХ было реализовано.

В то же время встраивание ДГК в бислой липосом ДПФХ переводило его из гелеподобного состояния в жидкокристаллическое при температуре менее 40 °С, и фазовый переход между этими двумя состояниями на термограммах исчезал (рис. 1). Этот результат согласуется с уменьшением микровязкости жидкокристаллического бислой ФХ в присутствии ДГК, обнаруженным методом ЭПР-спектроскопии. При этом инкапсулирование липосом ДПФХ-ДГК и ДПФХ-ДГК-ЭМГ конъюгатом не могло вернуть бислой из жидкокристаллического состояния в гелеподобное, как хорошо видно на рис. 1.

3.3. Защита ПНЖК от окисления

Высокая плотность (табл. 1) супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К, а также значительное возрастание микровязкости бислой инкапсулированных в нем липосом (табл. 2) препятствовали диффузии кислорода к ПНЖК, входящим в их состав, тем самым способствуя защите их от автоокисления кислородом воздуха. Об этом свидетельствовало отсутствие накопления малонового диальдегида в растворе комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К при его хранении в течение 24 сут при комнатной температуре на свету (рис. 2). При этом следует отметить, что такой эффективный растительный антиоксидант, как ЭМГ, также внесил вклад в эту защиту (рис. 2).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформированный супрамолекулярный комплекс ФХ-ДГК-ЭМГ-К отвечал всем требованиям, предъявляемым к системам доставки ну-

трицевтиков. Так, инкапсулирование конъюгатом Каз-На-МД липосомальной формы ДГК в присутствии ЭМГ, сопровождающееся значительным повышением микровязкости бислой липосом, ярко выраженной ассоциацией исходного конъюгата и повышением плотности комплекса, препятствовало окислению и деградации ДГК и ПНЖК фосфатидилхолина. Кроме этого, термодинамическое сродство комплекса к водной среде, а также его наноразмеры и высокий дзета-потенциал, обеспечивали его высокую водорастворимость. Это является одним из ключевых факторов, определяющих усвоение пероральной системы доставки в биологических жидкостях пищеварительного тракта, на более чем 90%, состоящих из воды.

В этом исследовании были использованы приборы ЦКП ИБХФ РАН (центра магнитной спектроскопии и сектора лазерного светорассеяния).

Авторы выражают благодарность фирмам Lipoid GmbH (Германия) и AVEBE Group (Нидерланды) за бесплатное предоставление образцов фосфатидилхолина и мальтодекстрин для этого исследования соответственно.

Работа Семёновой, Антиповой, Мартиросовой, Зеликиной и Пальминой была поддержана грантом № 21-16-00085 Российского научного фонда (<https://rscf.ru/project/21-16-00085/>): работа Анохиной и Богдановой, как разработчиков методологии проведения измерений поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (рег. № научной темы: 122041300204-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed M.K., Ahmed F., Tian H. et al. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2020. V. 19. № 1. P. 64.
2. Kalkman H.O., Hersberger M., Walitza S. et al. // Intern. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 9. Article 4393.
3. Patel A., Desai S.S., Mane V.K. et al. // Trends Food Sci. Technol. 2022. V. 120. P. 140.
4. Scotto di Palumbo A., McSwiney F.T., Hone M. et al. // J. Diet. Suppl. 2022. V. 19. № 4. P. 499.
5. Kharat M., McClements D.J. // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 557. P. 506.
6. Александрова В.А., Футорянская А.М. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 12. С. 66.
7. Шишикина Л.Н., Козлов М.В., Константинова Т.В. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 28.
8. Piwowarczyk L., Kucinska M., Tomczak S. et al. // Nanomaterials. 2022. V. 12. № 8. Article 1274.

9. *Na J.-Y., Song K., Kim S. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 460. № 2. P. 308.
10. *Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Лойко Н.Г. и др.* // *Хим. физика.* 2023. Т. 42. № 5. С. 30.
11. *Стовбун С.В., Веденкин А.С., Михалёва М.Г. и др.* // *Хим. физика.* 2022. Т. 41. № 12. С. 66.
12. *Falsafi S.R., Rostamabadi H., Samborska K. et al.* // *Pharmacol. Res.* 2022. V. 178. Article 106164.
13. *Gumus C.E., Davidov-Pardo G., McClements D. J.* // *Food Hydrocolloids.* 2016. V. 60. P. 38.
14. *Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K. et al.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. V. 52. № 3. P. 336.
15. Методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. М.: Роспотребнадзор, 2021. С. 72.
16. *Zelikina D., Chebotarev S., Komarova A. et al.* // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2022. V. 651. Article 129630.
17. *Buttefield D.A., Whisnant C.C., Chesnut D.B.* // *BBA.* 1976. V. 426 № 4. P. 697.
18. *Burchard W.* Light scattering technique. // *Physical techniques for the study of food biopolymers* / Ed. Ross-Murphy S.B. Glasgow: Blackie, 1994. P. 151.
19. *Pedroni V.I., Sierra M.B., Alaréon L.M. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2021. V. 1863. № 6. Article 183584.
20. *Dragicevic-Curic N., Friedrich M., Petersen S. et al.* // *Intern. J. Pharm.* 2011. V. 412. № 1–2. P. 85.

STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC PARAMETERS OF A BIOPOLYMERIC ORAL DELIVERY SYSTEM FOR LIPOSOMAL FORM OF A COMBINATION OF NUTRACEUTICALS

**M. G. Semenova^{1*}, A. S. Antipova¹, E. I. Martirosova¹, M. S. Anokhina¹,
D. V. Zelikina¹, N. G. Bogdanova¹, N. P. Palmina¹**

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.*

*E-mail: mariagersem@mail.ru

A liposomal form of a combination of hydrophobic nutraceuticals (omega-3 docosahexaenoic polyunsaturated fatty acid (DHA) and clove essential oil (CEO)) was prepared based on soya phosphatidylcholine (PC). The impact of DHA and CEO on the microviscosity of the bilayer of PC liposomes was investigated through the use of EPR spectroscopy. Furthermore, the influence of DHA and CEO on the phase state of the bilayer of model dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes was ascertained through the analysis of DSC data. A combination of EPR spectroscopy, DSC and laser light scattering methods was employed to investigate the effect of liposome encapsulation (PC-DHA-CEO) with a covalent conjugate (C) of sodium caseinate and maltodextrin on the structural state of the encapsulated liposome. Furthermore, the investigation concentrated on the structural characteristics (molar mass, size, density, architecture and zeta potential) and the thermodynamic parameters (osmotic second virial coefficient) of the water-soluble supramolecular complex PC-DHA-CEO-C. The key structural parameters of this complex have been identified as providing effective protection of PUFAs included in its composition from oxidation by air oxygen.

Keywords: liposomes, biopolymers, nutraceuticals, structure, thermodynamic parameters, supramolecular complex, delivery system.

REFERENCES

1. Ahmed M.K., Ahmed F., Tian H. et al. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **19**, 64 (2020).
2. Kalkman H.O., Hersberger M., Walitzka S. et al. // Int. J. Mol. Sci. **22**, 4393 (2021).
3. Patel A., Desai S.S., Mane, V.K. et al. // Trends Food Sci. Technol. **120**, 140 (2022).
4. Scotto di Palumbo A., McSwiney F.T., Hone M. et al. // J. Diet. Suppl. **19**, 499 (2022).
5. Kharat M., McClements D.J. // J. Colloid Interface Sci. **557**, 506 (2019).
6. Aleksandrova V.A., Futoryanskaya A.M. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 1394 (2023).
7. Shishkina L.N., Kozlov M.V., Konstantinova T.V. et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 141 (2023).
8. Piwowarczyk L., Kucinska M., Tomczak S. et al. // Nanomater. **12**, 1274 (2022).
9. Na J.-Y., Song K., Kim S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. **460**, 308 (2015).
10. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Loiko N.G., et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 608 (2023).
11. Stovbun S.V., Vedenkin A.S., Mikhaleva M.G., et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 1147 (2022).
12. Falsafi S.R., Rostamabadi H., Samborska K. et al. // Pharmacol. Res. **178**, 106164 (2022).
13. Gumus C.E., Davidov-Pardo G., McClements D.J. // Food Hydrocoll. **60**, 38 (2016).
14. Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. **52**, 336 (2016).
15. Methodical recommendations MR 2.3.1.0253-21. Norms of physiological needs in energy and food substances for different population groups of the Russian Federation. Moscow: Rospotrebnadzor, 2021. P. 72.
16. Zelikina D., Chebotarev S., Komarova A. et al. // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. **651**, 129630 (2022).
17. Buttefield D.A., Whisnant C.C., Chesnut D.B. // BBA. **426**, 697 (1976).
18. Burchard W., in *Physical techniques for the study of food biopolymers*, Ed. By RossMurphy S.B. (Blackie, Glasgow, 1994), p. 151.
19. Pedroni V.I., Sierra M.B., Alarcon L.M. et al. // Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1863**, 183584 (2021).
20. Dragicevic-Curic N., Friedrich M., Petersen S. et al. // Int. J. Pharm. **412**, 85 (2011).