

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 615.032.13

ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КАРНОЗИН: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

Н.А. Антонова¹, студент, Г.М. Сорокоумова^{1,@}, доцент, Т.Н. Федорова², заведующий лабораторией, С.А. Стволинский², ведущий научный сотрудник, Д.А. Абаймов², старший научный сотрудник, В.И. Попенко³, ведущий научный сотрудник, В.И. Швец¹, профессор

¹Кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва, 119571 Россия

²Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, 119991 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: galinams@yandex.ru

Настоящая работа посвящена созданию лекарственной формы природного дипептида карнозина в виде липосом, характеризующихся максимально возможной эффективностью включения карнозина. Для этого проведен подбор условий получения липосом, содержащих карнозин. Определены оптимальные липидный состав липосом, метод загрузки карнозина в липосомы, pH и температура получения липосом. В качестве липидов использовали дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и его смесь с холестерином (ХС). Сравнивали методы пассивной и активной загрузки карнозина в липосомы. В результате показано, что использование метода активной загрузки с помощью создания градиента pH сульфатом аммония позволяет получить липосомы с максимально возможной эффективностью включения, равной 41.7% (по данным ¹H-ЯМР-спектроскопии) при использовании в качестве липидов смеси ДПФХ-ХС (7:3). Методом динамического светорассеяния и электронной микроскопии было показано, что полученные из смеси ДПФХ-ХС липосомы с карнозином представляют собой сферические наночастицы со средним размером 133 нм. Кинетика высвобождения карнозина из липосом с липидным составом ДПФХ-ХС, изученная с помощью ячейки Франца, показала, что карнозин высвобождается из липосом в течение 24 ч. Исследование действия карнозиназы на липосомальный карнозин выявило, что большее количество карнозина сохранялось в неизменном виде при использовании липосом с липидным составом ДПФХ-ХС.

Ключевые слова: карнозин, липосомы, дипальмитоилфосфатидилхолин, метод активной загрузки липосом, карнозиназа.

CARNOSINE-CONTAINING LIPOSOMES: PREPARATION AND PROPERTIES

N.A. Antonova¹, G.M. Sorokoumova^{1,@}, T.N. Fedorova², S.L. Stvolynsky², D.A. Abaimov², V.I. Popenko³, V.I. Shvets¹

¹Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

²Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

³Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, 119991 Russia

@Corresponding author e-mail: galinams@yandex.ru

Carnosine is a natural dipeptide antioxidant. It is proved that it protects human's cells from oxidative stress. However, it has a short lifetime in a human organism due to the carnosinase activity. In order to solve this problem we used carnosine encapsulated in liposomes. Thus, the aim of this study was the creation of a new liposomal carnosine drug form. We used two encapsulation methods that show different carnosine behavior: a passive and an active one. We took into account that conditions of obtaining liposomes such as lipid composition, pH and temperature are important. In this study the lipid composition providing the maximum encapsulation efficiency was determined. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and its mixture with cholesterol (Chol) were

used as composition lipids. It was shown that the active encapsulation method using the creation of ammonium sulphate pH gradient provided the best results: 41.7% encapsulation efficiency (according to NMR spectroscopy) when using DPPC:Chol (7:3) mixture as lipids. Moreover, the properties of the liposomes were studied. Using the dynamic light scattering and electron microscopy methods carnosine liposomes (DPPC:Chol) were shown to be spherical nanoparticles with an average size of 133 nm. Carnosine release kinetics studied with the use of a France's cell showed that carnosine was released in 24 hours (liposomal composition DPPC:Chol was 7:3). A study of carnosinase action on liposomal carnosine showed that the maximum amount of carnosine remained unchanged in DPPC:Chol liposomes (7:3). The results of the study make it possible to conclude that liposomal carnosine has a better activity in the human organism.

Keywords: carnosine, liposomes, dipalmitoylphosphatidylcholine, active carnosine encapsulation method, carnosinase.

Введение

В последние годы значительно возрос интерес исследователей к карнозину – дипептиду природного происхождения, известному уже более 100 лет. Карнозин встречается в мышечных и нервных тканях человека и других млекопитающих и выполняет функции гидрофильного внутриклеточного антиоксиданта, который обладает антиишемическим, репаративным, антикатарактальным действием [1–3]. На сегодняшний день карнозин, в основном, применяется как биологически активная добавка, и только при катаракте используется лекарственная форма – глазные капли. В России и за рубежом активно ведутся работы по созданию лекарственных препаратов, содержащих карнозин [4–7]. В настоящее время предприняты попытки использования карнозина в виде биологически активной добавки «Севитин» для повышения эффективности базисной терапии у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией [8] и болезнью Паркинсона [9]. На экспериментальных моделях паркинсонизма, ишемии головного мозга, болезни Альцгеймера, старения, а также в пилотных клинических исследованиях было показано нейропротекторное действие карнозина. Однако для достижения стабильного протекторного эффекта у пациентов требуется введение высоких суточных доз карнозина – от 1.5 до 2.0 г, чтобы компенсировать его гидролиз под действием тканевой и сывороточной карнозины. Для увеличения времени жизни карнозина проводят химическую модификацию, получая его производные, например, сложные эфиры и их соли [10], которые трудно расщепляются этим ферментом.

Другим подходом, который позволяет защитить лекарственный препарат от деградации и вместе с этим пролонгировать его действие в организме, является создание липосомальной формы действующей субстанции. Липосомы – наночастицы, имеющие внутреннее водное пространство, окруженное липидным бислоем [11]. Именно благодаря наличию липидного бислоя липосомы способны изолировать препарат, например, дипептид, от прямого воздей-

ствия фермента и обладают свойством изменять фармакокинетику лекарственных препаратов, повышая их фармакологическую эффективность [12].

В работе [13] исследовали включение карнозина в липосомы, состоящие из различных синтетических липидов: дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ), диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ). При этом было показано, что эффективность включения карнозина уменьшалась в ряду липосом следующим образом: ДПФХ > ПОФХ > ДОФХ и составила, соответственно, 21.96, 18.86 и 17.12%. В упомянутой работе липосомы получали путем экструзии с использованием метода пассивной загрузки.

Целью настоящей работы являлась оптимизация способа получения липосомальных форм карнозина, обладающих большей эффективностью его включения, изучение их морфологии и размеров, а также определение кинетики высвобождения карнозина из липосом и действия карнозины на липосомальный карнозин.

Экспериментальная часть

В работе использовали карнозин (Yonezawa Hamari Chemicals, Ltd, Япония), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), холестерин (ХС) (Sigma-Aldrich, США), хлороформ, этиловый спирт, дистиллированную воду, дейтерированную воду, хлорид натрия, сульфат аммония марки х.ч. (Химмед, Россия).

Для регистрации электронных спектров использовали спектрофотометр Shimadzu UV-1700 (Япония), спектров ¹H-ЯМР – спектрометр BrukerBioSpin 300 GmbH (Германия). Электронные микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа JEOL 100CX (Япония). Размеры липосом определяли методом динамического светорассеяния на приборе Delsa NanoC, Beckman CoulterInc (США). Определение карнозина в реакции с карнозиной проводили методом хромато-масс-спектрометрии с помощью хроматографа Surveyor LC PumpPlus в сочетании с масс-спектрометрическим детектором LCQ Fleet (Thermo Scientific,

США); аналитическая колонка – Ultrasphere ODS (250 × 4.6 мм; C18, 100А, 5 мкм; Nichrom Ltd, Великобритания).

Включение карнозина в липосомы проводили методами пассивной [14] и активной [15] загрузки.

Получение липосом с карнозином методом пассивной загрузки. Липиды (ДПФХ или смесь ДПФХ-ХС в соотношении 7:3) в количестве 40 мг помещали в круглодонную колбу и растворяли в хлороформе. Растворитель удаляли на ротаторном испарителе, и полученную липидную пленку диспергировали водным раствором карнозина с концентрацией 20 мг/мл, содержащим 0.9% NaCl. Таким путем получали мультламеллярные везикулы (МЛВ). Затем методом экструзии при многократном продавливании МЛВ через фильтр с порами 100 нм (19 раз) получали одноламеллярные везикулы (ОЛВ). Эксперименты проводили при различных pH (6.3; 7.1; 8.2).

Получение липосом с карнозином методом активной загрузки. Липиды (ДПФХ или смесь ДПФХ-ХС в соотношении 7:3) в количестве 40 мг помещали в круглодонную колбу и растворяли в хлороформе. Растворитель удаляли на ротаторном испарителе, и полученную липидную пленку диспергировали 1 мл 0.3 М раствора сульфата аммония. После этого получали ОЛВ методом экструзии (как указано выше). Затем полученные ОЛВ в количестве 500 мкл наносили на колонку для эксклюзионной хроматографии NAP-5 с сорбентом Sephadex G25 для отделения липосом от сульфата аммония. Далее отбирали 0.75 мл полученных липосом, добавляли 0.25 мл раствора карнозина ($C_{исх.} = 20$ мг/мл) и выдерживали препарат на водяной бане в течение 30 мин. Эксперименты проводили при температуре 50 и 60°C.

Определение эффективности включения карнозина в липосомы методом ¹H-ЯМР. Для определения эффективности включения карнозина в липосомы с помощью метода ¹H-ЯМР при получении ОЛВ вместо дистиллированной воды и изотонического раствора была использована дейтерированная вода. Растворы с различными значениями pH получали добавлением DCl. Полученные ОЛВ (600 мкл) помещали в ампулу для ЯМР-образцов. Регистрацию спектров проводили на ЯМР-спектрометре с частотой 300 Гц, число сканов 11, число точек 128000.

Определение скорости высвобождения карнозина из липосом. Для установления скорости высвобождения карнозина из липосом использовали ячейку Франца. Эксперимент проводили с липосомами, имеющими липидный состав ДПФХ-ХС (7:3), приготовленными методом активной загрузки. Для этого липосомы с карнозином помещали в донорную камеру, а в реципиентную камеру – изотонический раствор. Между камерами был установлен фильтр с диаме-

тром пор 60 нм. Фракции собирали первые 7 ч через один час, потом через 24 ч. Концентрацию карнозина устанавливали методом диазореакции, описанным в работе [16].

Определение действия карнозиназы, содержащейся в сыворотке крови, на липосомальный карнозин проводили аналогично [17].

Получение сыворотки, содержащей карнозиназу, из крови доноров. Кровь отбирали из вены доноров натощак, центрифугировали при 1000 г в течение 15 мин, отбирали сыворотку, затем объединяли образцы от 5-6 доноров, делили их на аликвоты по 1.5 мл и замораживали при -80°C. У всех участников было получено добровольное согласие на взятие биоматериала.

Действие карнозиназы на липосомальный карнозин. После размораживания 200 мкл сыворотки преинкубировали при 37°C в течение 30 мин в инкубационной среде следующего состава: 800 мкл 125 мМ Tris-HCl, pH 7.8; 300 мкл 5 мМ CdCl₂, приготовленного на 30 мМ цитрате Na; 300 мкл H₂O. Затем реакцию запускали добавлением 400 мкл дисперсии липосом, содержащих карнозин, или раствора карнозина; стартовая концентрация субстратов составляла 5 мг/мл по карнозину (22 мМ). В 0 – 15 – 30 – 60 – 90 – 120 – 150 – 180 мин отбирали пробы инкубационной смеси объемом 100 мкл и смешивали их с 400 мкл охлажденного 20%-ного водного раствора ТХУ для осаждения белков в ультрацентрифуге при 16000 г в течение 10 мин при +5°C. Полученный супернатант переносили в хроматографическую виалу, которую помещали в автосамплер хроматографа для хромато-масс-спектрометрического анализа.

Содержание карнозина в липосомах, подвергшихся действию сывороточной карнозиназы, определяли методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Приготовленный, как описано выше, супернатант вводили в петлю хроматографа в объеме 10 мкл. Подвижная фаза состояла из двух растворов: 10 мМ ацетата аммония, доведенного до pH 3.7 ледяной уксусной кислотой (раствор А), и смеси ацетонитрил – 10 мМ ацетат аммония (90:10) (раствор Б), взятых в соотношении 85:15. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.7 мл/мин, температура разделения 35°C. Продолжительность хроматографирования – 10 мин. Время удерживания карнозина – 5.59±0.1 мин. Масс-спектрометр работал в режиме регистрации ионов, положительно заряженных электропреем, создаваемым напряжением в 5 кВ. Карнозин определяли по суммарному ионному току дочерних ионов в диапазоне масс от 60 до 250 а.е.м., образующихся при распаде молекулярного иона карнозина (m/z 227.1) при нормализованной энергии соударений 25 eV. Данные обрабатывались с помощью

программы Xcalibur 2.1 Foundation 1.0.1. Для количественного измерения концентрации карнозина применяли метод внешнего стандарта. При градуировке измеряли соотношение площадей хроматографических пиков карнозина в зависимости от его концентрации. Градуировочная зависимость для карнозина была линейной и описывалась формулой: $C_{\text{карн.}} = 0.28784 \cdot S_{\text{карн.}}$, где $C_{\text{карн.}}$ – концентрация карнозина (мкг/мл), $S_{\text{карн.}}$ – площадь пика карнозина в единицах интегрирования. Коэффициент корреляции составил $R_2 = 0.997$, что соответствует надлежащей аналитической аппроксимации. Предел количественного определения составлял 0.39 мкг/мл. Метод был метрологически валидирован. Ошибка метода не превышала 10%.

Результаты и обсуждение

Карнозин – хорошо растворимый в воде дипептид (β -аланил-L-гистидин), при различных pH имеющий разные ионизированные формы: например, в растворе с pH 6.3 преобладает его цвиттер-ионная форма (70.84%), а при pH 7.1 и 8.2 карнозин имеет анионную форму (72.65 и 95.66% соответственно) [18]. Основываясь на литературных данных [13] и физико-химических свойствах карнозина, для получения липосом, характеризующихся высокой эффективностью включения (ЭВ), и уменьшения риска выхода карнозина из водного простран-

ства липосом, мы решили использовать следующие липиды: синтетический фосфолипид ДПФХ, обладающий насыщенными жирнокислотными остатками, что обеспечивает жесткую структуру липидного бислоя липосом, а также смесь липидов – ДПФХ-ХС (7:3), поскольку введение холестерина делает липосомы еще более прочными, уплотняя липиды в бислое. Вместе с этим для достижения максимально возможного содержания карнозина в липосомах варьировали метод загрузки, pH среды и температуру.

Эффективность включения карнозина в липосомы определялась методом ^1H -ЯМР-спектроскопии. Использование такого подхода было описано в работе [13]. Преимущество этого метода заключается в том, что нет необходимости проводить предварительное разделение включенного в липосомы и свободного (не включенного в липосомы) карнозина различными методами, например, гель-хроматографией, что исключает возможность утечки карнозина из липосом. Возможность дифференцировать в ^1H -ЯМР спектре липосомальный и свободный карнозин основана на том, что в молекуле карнозина есть два pH-чувствительных протона в имидазольном кольце гистидина, которые в спектре ^1H -ЯМР имеют сигналы, различающиеся по значению химических сдвигов. На рис. 1 представлена область протонов *a* и *б* имидазольного кольца карнозина в спектрах ^1H -ЯМР карнозина в водных растворах при различных pH.

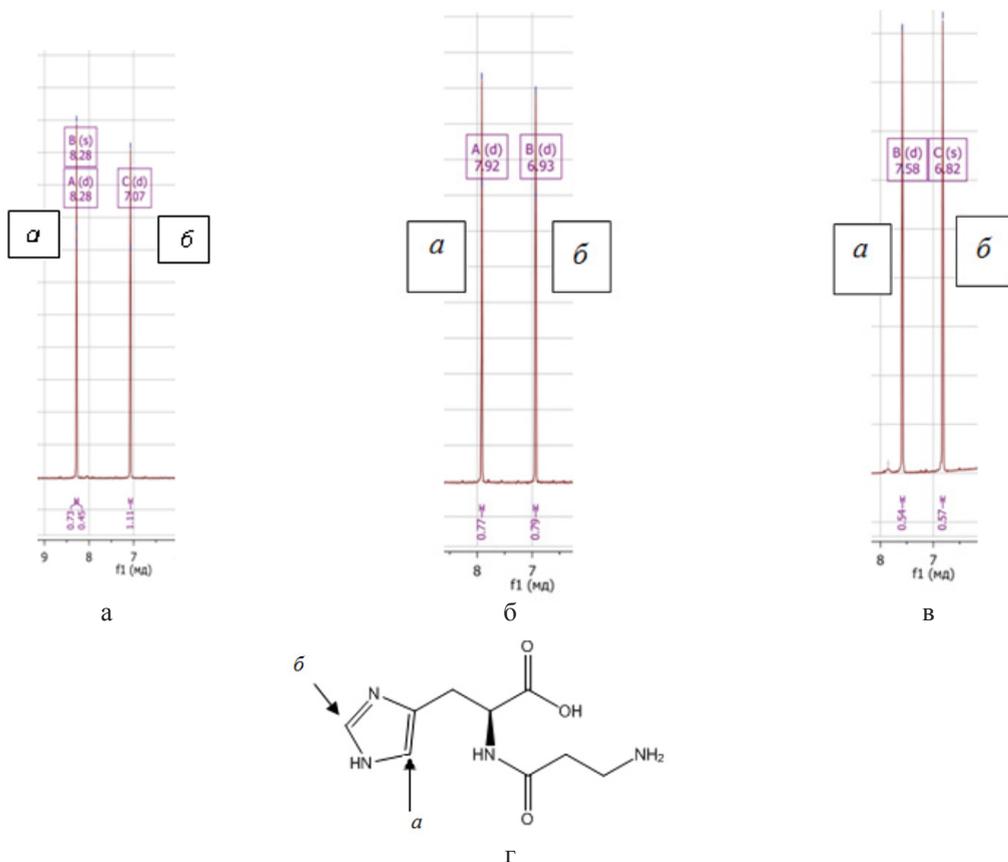


Рис. 1. Фрагменты ^1H -ЯМР-спектров карнозина в водных растворах при различных pH: а) 6.3; б) 7.1; в) 8.2 в области сигналов протонов *a* и *б* имидазольного кольца карнозина (г).

Из рис. 1 видно, что при рН 6.3 химический сдвиг сигнала протона *a* равен 8.28 м.д., а протона *b* – 7.07 м.д.; при рН 7.1 химический сдвиг сигнала протона *a* – 7.92 м.д., протона *b* – 6.93 м.д.; при рН 8.2 химический сдвиг сигнала протона *a* – 7.57 м.д., протона *b* – 6.81 м.д., т.е. наиболее выражены изменения химических сдвигов в зависимости от рН для сигналов протонов *a* имидазольного кольца гистидина: с увеличением рН сигнал сдвигается в область слабого поля. Это свойство карнозина и было использовано нами в дальнейшей работе.

Первоначально включение карнозина в липосомы проводили методом пассивной загрузки.

Анализируя методом ¹H-ЯМР образцы липосом, содержащих карнозин, полученные при различных рН методом пассивной загрузки, мы обнаружили, что сигналы от протона *a* имидазольного кольца карнозина, включенного в липосомы, меняли поло-

жение в зависимости от рН. Так, при рН 6.3 наряду с сигналом 8.3 м.д. (от свободного карнозина) появлялся сигнал в области слабого поля 8.03 м.д. (от липосомального карнозина); при рН 7.1 второй сигнал не фиксировался, т.е. сдвига сигнала не было; а при рН 8.2 новый (второй) сигнал появлялся в области более сильного поля 7.86 м.д. (от липосомального карнозина), сигнал 7.60 м.д. соответствовал наличию свободного карнозина (рис. 2). Таким образом, как было показано в работе [13] и подтверждено нами, в липосомах, по-видимому, создается рН, близкий к 7.1, поэтому в липосомах, полученных при рН 7.1, сигналы протонов имидазольного кольца липосомального и свободного карнозина не отличаются. В образцах, полученных при других значениях рН, карнозин, включенный в липосомы, в спектре ¹H-ЯМР можно определить по сигналу имидазольного протона *a* 8.03 м.д. при рН 6.3 или 7.86 м.д. при рН 8.2 (рис. 2).

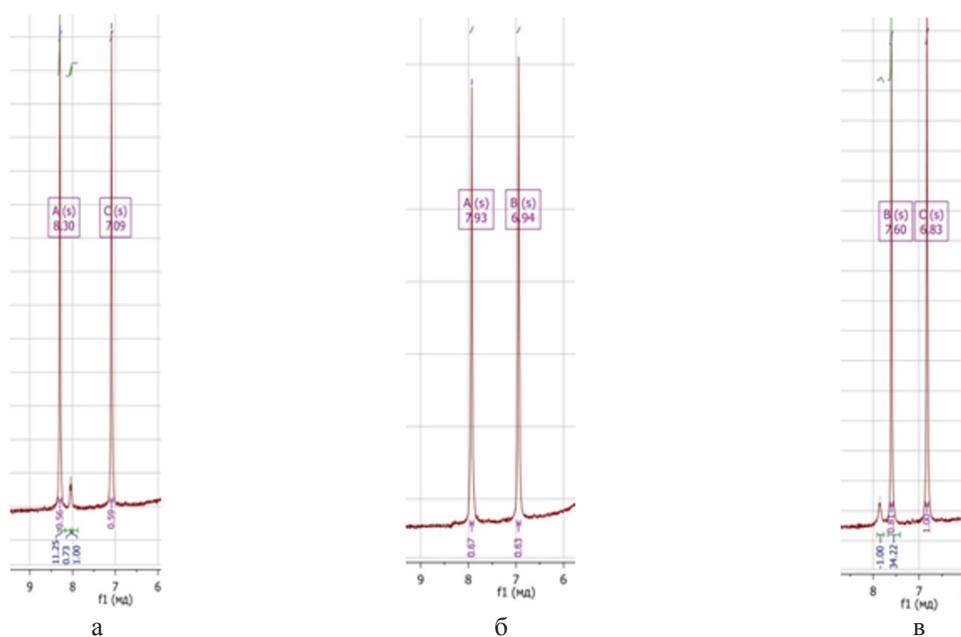


Рис. 2. Фрагменты ¹H-ЯМР-спектров в области сигналов протонов имидазольного кольца свободного и липосомального (ДПФХ-ХС (7:3)) карнозина, полученного при пассивной загрузке, при различных рН: а) 6.3; б) 7.1; в) 8.2.

Интегрированием сигналов имидазольных протонов *a*, соответствующих липосомальному и

$$\text{ЭВ} = \left(\frac{m_{\text{карнозина в липосомах}}}{m_{\text{карнозина исход}}} \right) \times 100\% = \left(\frac{I_{\text{карнозина в липосомах}}}{(I_{\text{карнозина в липосомах}} + I_{\text{карнозина свободного}})} \right) \times 100\%$$

свободному карнозину, рассчитали эффективность включения карнозина (ЭВ) в липосомы по формуле:

Результаты экспериментов с липосомами, полученными пассивной загрузкой, представлены в табл. 1. Из табл. 1 видно, что по данным ЯМР-анализа, максимальной ЭВ карнозина в липосомы в рамках метода пассивной загрузки – 11.5% удалось добиться при липидном составе липосом ДПФХ-ХС (7:3) и рН 8.2. Это значение ЭВ близко к результатам работы [13].

Следующим этапом нашей работы в достижении более высокой ЭВ карнозина в липосомы было использование метода активной загрузки путем соз-

дания градиента рН с помощью сульфата аммония. Такой подход подробно описан в работах [14, 15, 19].

Анализ методом ¹H-ЯМР образцов липосом с карнозином (рН 8.2) в этом случае показал, что химический сдвиг протона *a* имидазольного кольца карнозина, включенного в липосомы, равнялся 7.96 м.д., а в случае свободного карнозина – 7.65 м.д. ЭВ карнозина в липосомы рассчитывали по формуле, приведенной выше.

Результаты влияния липидного состава липосом и температуры на ЭВ карнозина в липосомы, полу-

Таблица 1. Зависимость эффективности включения карнозина, определенной методом ¹H-ЯМР, от липидного состава липосом ($C_{\text{липидов}} = 40$ мг/мл) и pH среды при пассивной загрузке

Состав липосом	pH среды	Эффективность включения, %
ДПФХ	6.3	8±5
ДПФХ	7.1	не определена
ДПФХ	8.2	7±5
ДПФХ-ХС (7:3)	8.2	11.5±5

ченные методом активной загрузки, представлены в табл. 2.

Изменение температуры процесса активной загрузки не влияло на эффективность включения карнозина в липосомы. Наибольшее включение карнозина в липосомы, определенное методом ¹H-ЯМР, было достигнуто при липидном составе липосом ДПФХ-ХС (7:3) и составило 41.7%. Содержание карнозина в липосомах из ДПФХ было незначительно меньше.

В табл. 2 приведен средний диаметр липосом, полученных методом активной загрузки, измеренный с помощью динамического светорассеяния.

Таблица 2. Зависимость эффективности включения карнозина от липидного состава липосом ($C_{\text{липидов}} = 40$ мг/мл) и температуры и размеры липосом с карнозином при активной загрузке, pH 8.2

Состав липосом	Температура, °C	Эффективность включения, %	Средний диаметр липосом, нм
ДПФХ	50 и 60	40.5±5	1941±20
ДПФХ-ХС (7:3)	60	41.7±5	133±20

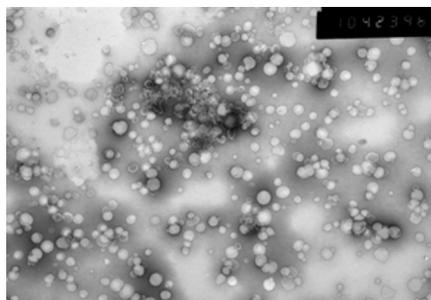


Рис. 3. Микрофотография липосом липидного состава ДПФХ-ХС (7:3) с карнозином, полученных методом активной загрузки (увеличение 10 000×).

Одной из основных характеристик липосомальной формы препарата является скорость высвобождения лекарственной субстанции из липосом. Нами для установления скорости высвобождения карнозина из липосом была использована ячейка Франца. Анализировали липосомы состава ДПФХ-ХС, контрольным образцом был водный раствор карнозина. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.

Из представленных данных видно, что диффузия карнозина из раствора проходила в течение 6 ч, а карнозин из липосом выходил в течение 24 ч.

На завершающем этапе работы было определено действие сывороточной карнозины на липосомальный карнозин. Для этого образцы карнозин-содержа-

щих липосом инкубировали с сывороткой доноров в условиях, описанных в Экспериментальной части. Определение содержания в пробах карнозина после действия карнозины проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием масс-спектрометрического детектора. Результаты представлены на рис. 5.

Анализ размеров полученных липосом показал, что липосомы с карнозином из ДПФХ нестабильны и с течением времени происходит их агрегация (частицы достигают размеров 2 мкм). В то же время липосомы с карнозином, имеющие липидный состав ДПФХ-ХС (7:3), наиболее стабильны и сохраняют свои наноразмеры долгое время.

Электронная микрофотография липосом состава ДПФХ-ХС (7:3) с карнозином, полученных методом активной загрузки, представлена на рис. 3. Видно, что липосомы обладают сферической формой, гладкой поверхностью и гомогенны по размеру.

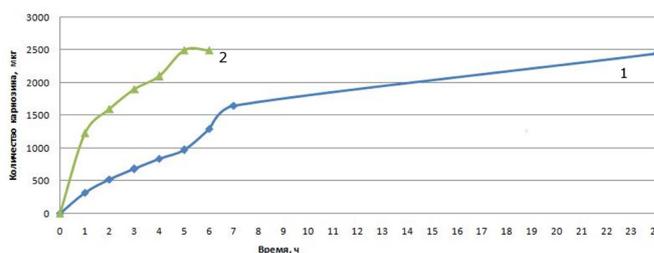


Рис. 4. Кинетика высвобождения карнозина из липосом с липидным составом ДПФХ-ХС (7:3) (1) и диффузия карнозина из контрольного раствора, $C_{\text{карнозина}} = 2.5$ мг/мл (2), определенные с помощью ячейки Франца.

Анализ результатов показал, что лучше защищен карнозин, находящийся в липосомах, имеющих липидный состав ДПФХ:ХС (7:3). Так, после 3 ч инкубации этих липосом с карнозиной сохранилось около 12% нативного, не расщепленного на аминокислоты карнозина, а в липосомах из ДПФХ содержание карнозина составило только 7%.

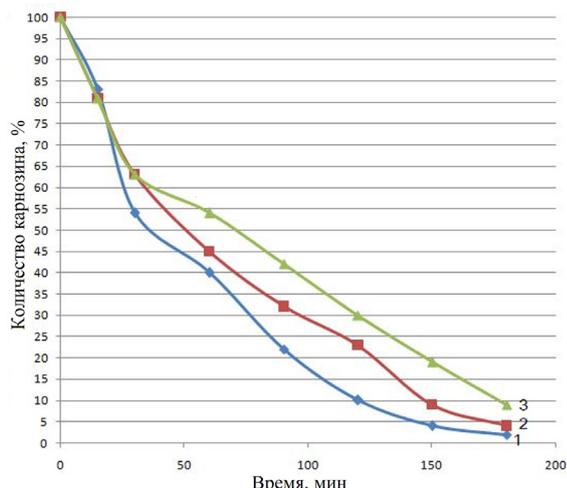


Рис. 5. Динамика изменения содержания карнозина в условиях гидролиза сывороточной карнозиной в растворе (1) и в дисперсии карнозин-содержащих липосом разного липидного состава: ДПФХ (2), ДПФХ-ХС (7:3) (3).

Список литературы

1. Болдырев А.А. Карнозин: Биологическое значение и возможности применения в медицине. М.: Изд-во МГУ, 1998. 326 с.
2. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. № 4. P. 1803–1845.
3. Фадеева Д.А., Халикова М.А., Жилиякова Е.Т., Новиков О.О., Новикова М.Ю., Попов Н.Н., Сорокопудов В.Н. // *Научные ведомости Белгородского гос. ун-та: Серия: Медицина. Фармация.* 2010. № 22 (93). Вып. 12. С. 179–184. DOI: 10.1089/rej.2008.0716
4. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д., Бохан Н.А. // *Успехи современного естествознания.* 2015. № 4. С. 106–113.
5. Cararo J.H., Streck E.L., Schuck P.F., Ferreira G. da C. // *Aging & Disease.* 2015. V. 6. № 5. P. 369–379. DOI: 10.14336/AD.2015.0616
6. Babizhayev M.A., Micans P., Guiotto A., Kasus-Jacobi A. // *Amer. J. Therapeutics.* 2009. V. 16. P. 517–533. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318195e327
7. Капцов В.В., Болдырев А.А., Кулебякин К.Ю., Стволинский С.Л., Суслина З.А., Иллариошкин С.Н. Применение L-карнозина для приготовления нанопрепарата, обладающего антигипоксической и антиоксидантной активностью: пат. 2482867 Рос. Федерация. № 2012110343/15; заявл. 20.03.2012; опубл. 27.05.2013. Бюл. № 15.
8. Федорова Т.Н., Беляев М.С., Трунова О.А., Гнездицкий В.В., Максимова М.Ю., Болдырев А.А. // *Биол. мембраны.* 2008. Т. 25. № 6. С. 479–483.
9. Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bageyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. //

Заключение

В ходе работы были подобраны условия получения липосом, обеспечивающих максимально возможную эффективность включения карнозина (состав липосом ДПФХ-ХС, 7:3); показано, что полученные липосомы, представляют собой гомогенные по размеру сферические наночастицы, высвобождение карнозина из которых происходит постепенно, и карнозин, находящийся в липосомах, лучше защищен от воздействия карнозины.

Получение липосомальных форм карнозина открывает перспективы проведения экспериментальных исследований с целью оценки эффективности их нейропротекторного действия в моделях заболеваний ЦНС и разработки нового лекарственного препарата.

Благодарности

Работа по получению липосомальной формы карнозина проведена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ, регистрационный номер НШ-7946.2016.11.

References:

1. Boldyrev A.A. Carnosine: Biological significance and application in medicine. Moscow: MSU Publ., 1998. 326 p. (in Russ.).
2. Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W. *Physiological Reviews.* 2013. V. 93. № 4. P. 1803–1845. DOI: 10.1152/physrev.00039.2012
3. Fadeeva D.A., Khalikova M.A., Zhilyakova E.T., Novikov O.O., Novikova M.Yu., Popov N.N., Sorokopudov V.N. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gos. unversiteta. Ser. Medicina. Farmatsiya (Journal of BGU. Ser. Medicine. Pharmacy).* 2010. № 22 (93). Is. 12. P. 179–184. (in Russ.). DOI: 10.1089/rej.2008.0716
4. Yarigina E.G., Prokop'eva V.D., Bokhan N.A. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya (Successes of Modern Natural Sciences).* 2015. № 4. P. 106–113. (in Russ.).
5. Cararo J.H., Streck E.L., Schuck P.F., Ferreira G. da C. *Aging and Disease.* 2015. V. 6. № 5. P. 369–379. DOI: 10.14336/AD.2015.0616
6. Babizhayev M.A., Micans P., Guiotto A., Kasus-Jacobi A. *Amer. J. Therapeutics.* 2009. V. 16. P. 517–533. DOI: 10.1097/MJT.0b013e318195e327
7. Kaptsov V.V., Boldyrev A.A., Kulebyakin K.Yu., Stvolynsky S.L., Suslina Z.A., Illarioshkin S.N. The use of L-carnosine for the preparation of nanopreparation possessing antihypoxic and antioxidant activity: pat. 2482867 Russian Federation. № 2012110343/15; appl. 20.03.2012; publ. 27.05.2013. (in Russ.).
8. Fedorova T.N., Belyaev M.S., Trunova O.A., Gnezdizkiy V.V., Maximova M.Yu., Boldyrev A.A. *Biologicheskie membrany (Biological Membranes).* 2008. V. 25. № 6. P. 479–483. (in Russ.).

- Rejuvenation Res. 2008. V. 11. № 4. P. 821–827. DOI: 10.1089/rej.2008.0716
10. Болдырев А.А., Никаноров В.А., Хребтова С.Б., Булыгина Е.Р., Крамаренко Г.Г., Лейнсоо Т.А., Сорокина Е.В., Стволинский С.Л., Тюлина О.В., Федорова Т.Н., Юнева М.О. Способ получения сложных эфиров L-карнозина и их солей: пат. 2188204 Рос. Федерация. № 20011111960; заявл. 26.04.2001; опубл. 27.08.2002.
11. Каплун А.П., Ле Банг Ш., Краснопольский Ю.М., Швеце В.И. // Вопросы мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 3–12.
12. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М: Издательство ЛКИ, 2011. 280 с.
13. Maherani B., Arab-Tehrany E., Kheirilomoom A., Cleymand F., Linder M. // Food Chem. 2012. V. 134. P. 632–640. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.098
14. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. // Хим.-фарм. журн. 2011. Т. 45. № 8. С. 30–40.
15. Барышников А.Ю. // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 3. С. 23–31.
16. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии, 2-е изд. М: МГУ, 1989. 509 с.
17. Pegova A., Abe H., Boldyrev A. // Comp. Biochem. Physiol. 2000. V. 127. Part B. P. 443–446. DOI: 10.1016/S0305-0491(00)00279-0
18. Chemicalize.org by ChemAxon [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.chemicalize.org/> (Дата обращения: 08.08.2016).
19. Sousa I., Gameiro P. // J. Pharmaceut. and Drug Delivery Res. 2013. V. 2. Is. 2. P. 1–4. DOI: 10.4172/2325-9604.1000114
9. Boldyrev A., Fedorova T., Stepanova M., Dobrotvorskaya I., Kozlova E., Boldanova N., Bagyeva G., Ivanova-Smolenskaya I., Illarioshkin S. Rejuvenation Research. 2008. V. 11. № 4. P. 821–827. DOI: 10.1089/rej.2008.0716
10. Boldyrev A.A., Nikanorov V.A., Khrebtova S.B., Bulygina E.R., Kramarenko G.G., Leinsoo T.A., Sorokina E.V., Stvolynsky S.L., Tyulina O.V., Fedorova T.N., Yuneva V.O. A method of producing esters of L-carnosine and their salts: pat. 2188204 Russian Federation. № 20011111960; appl. 26.04.2001; publ. 27.08.2002. (in Russ.).
11. Kaplun A.P., Le Bang Sh., Krasnopolskiy Yu.M., Shvets V.I. Voprosy Med. Khimii (Questions of Medical Chemistry). 1999. V. 45. № 1. P. 3–12. (in Russ.).
12. Tarakhovskiy Yu.S. Intelligent lipid nanocontainers in the targeted drugs delivery. Moscow: LKI Publ., 2011. 280 p. (in Russ.).
13. Maherani B., Arab-Tehrany E., Kheirilomoom A., Cleymand F., Linder M. Food Chemistry. 2012. V. 134. P. 632–640. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.098
14. Tazina E.V., Kostin K.V., Oborotova N.A. Khimiko-pharmatcevticheskiy zhurnal (Chem.- Pharm. Journal). 2011. V. 45. № 8. P. 30–40 (in Russ.).
15. Baryshnikov A.Yu. Vestnik Rossiyskoi Akademii Meditsinskikh Nauk (Herald of Russian Academy of Medical Sciences). 2012. № 3. P. 23–31 (in Russ.).
16. Severin S.E., Solov'eva G.A. Biochemistry practicum. Moscow: MSU Publ., 1989. 509 p. (in Russ.).
17. Pegova A., Abe H., Boldyrev A. Comp. Biochem. Physiol. 2000. V. 127. Part B. P. 443–446. DOI: 10.1016/S0305-0491(00)00279-0
18. Chemicalize.org by ChemAxon [web resource] – access mode: <http://www.chemicalize.org/> – (accessed date: 08.08.2016).
19. Sousa I., Gameiro P. J. Pharmaceut. and Drug Delivery Res. 2013. V. 2. Is. 2. P. 1–4. DOI: 10.4172/2325-9604.1000114