

СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ И ФОРМА СВОБОДНЫХ И ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРАМИ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА В ОТСУТСТВИИ И В ПРИСУТСТВИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ[†]

© 2018 г. Н.П. Пальмина, Е.Л. Мальцева, В.И. Бинюков, В.В. Каспаров, А.С. Антипова, М.Г. Семёнова

Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: npalm@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.16 г.

Методами электронного парамагнитного резонанса и атомно-силовой спектроскопии исследованы липосомы, приготовленные из фосфатидилхолина сои с встроенными растительными антиоксидантами (экстрактами имбиря, душистого и черного перцев, эфирного масла гвоздики и др.) и инкапсулированные в биополимеры (казеинат натрия или ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстринами). Методом электронного парамагнитного резонанса с использованием парамагнитного зонда 16-доксилстеариновой кислоты установлено, что растительные антиоксиданты снижают микровязкость глубоколежащих областей липидного бислоя липосом на 15–25%, наибольшим эффектом обладал экстракт имбиря (24%). Казеинат натрия и ковалентный конъюгат казеината натрия с мальтодекстринами (декстрозные эквиваленты 2 и 10) увеличивали на 30–35% микровязкость и по отношению к свободным липосомам, и по отношению к липосомам с антиоксидантом. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что введение антиоксидантов увеличивает площадь поперечного сечения и объем липосом, а инкапсулирование в полимеры приводит к уплотнению липосом и созданию их более плотной структуры.

Ключевые слова: липосомы из фосфатидилхолина, растительные антиоксиданты, микровязкость липидов, атомно-силовая микроскопия, биополимеры.

Одним из наиболее важных и быстро развивающихся направлений в области разработки функциональных продуктов питания является молекулярный дизайн пищевых ингредиентов, как систем доставки нутрицевтиков. К нутри-

цевтикам относятся: антиоксиданты, незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 и омега-6), фосфолипиды, витамины (группа В, группа Е и др.), широкий спектр витаминоподобных веществ (L-карнитин, липоевая

Сокращения: ФХ – фосфатидилхолин, ДЭ – декстрозный эквивалент, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

[†] Год назад, 25 сентября 2016 года, ушла из жизни Елена Борисовна Бурлакова, известный биофизик и радиобиолог, доктор биологических наук, профессор, один из основоположников научного направления о механизмах перекисного окисления липидов в биологических мембранах и их роли в развитии основных метаболических процессов в норме и патологии. Елена Борисовна всю свою жизнь проработала сначала в Институте химической физики имени Н.Н. Семёнова РАН, а затем была организатором и душой отделившегося от него Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, где заведовала лабораторией и одновременно была заместителем директора. У Елены Борисовны много учеников и научных последователей и у нас в стране, и за ее пределами, она обладала удивительной способностью объединять и сплачивать людей для осуществления своих научных замыслов; умела будоражить научное сообщество, часто обращаясь к весьма спорным и далеко не всеми принимаемым идеям, будь то роль свободных радикалов и антиоксидантов в биологии (в 1960–1970 гг.) или механизмы действия биологически активных веществ в сверхнизких концентрациях (1990–2010 гг.). С ней никогда не было скучно, она всегда была центром вихревых научных потоков и центром дискуссий. Ее друзья, соратники и ученики навсегда запомнят ее молодой, красивой и невероятно харизматичной личностью, свет которой будет их всегда поддерживать и ободрять...

В последние годы своей жизни Елена Борисовна очень интересовалась растительными природными антиоксидантами, полагая, что это новая страница в исследовании роли антиоксидантов в биологических процессах, в частности в создании полезных пищевых продуктов будущего. Поэтому данную статью, которая является неким развитием высказанной ею идеи, мы посвящаем памяти Елены Борисовны Бурлаковой, замечательного ученого и человека.

кислота, холин, убихинон и др.), различные группы полифенолов, индолы, органические кислоты (яблочная, янтарная, гидроксимионная) и др. [1–4].

Необходимость молекулярного дизайна систем доставки нутрицевтиков вызвана тем, что, за исключением водорастворимых витаминов и изофлавонов, большинство из них являются липофильными соединениями, которые трудно растворимы в водной среде и в биологических жидкостях организма. Многие из этих веществ, благодаря содержанию ненасыщенных двойных связей в составе их молекул, легко окисляются кислородом воздуха и разрушаются под воздействием света, высоких температур и экстремальных значений pH, и в связи с этим требуют защиты от окисления и деградациии при их длительном хранении и в экстремальных условиях процессов производства пищевых продуктов [2,3].

Ранее в работах [3,5–8] было установлено, что одним из успешных способов решения указанной проблемы может быть разработка комплексных многофункциональных пищевых ингредиентов на основе липосом соевого фосфатидилхолина и пищевых биополимеров, объединяющих высокую растворимость и функциональность биополимеров с полезными свойствами полиненасыщенных липидов.

Так как многие физиологические и биохимические процессы, связанные с последующими процессами всасывания и метаболизма введенных нутрицевтиков, зависят не только от их состава, но и от физико-химических свойств [9–12], целью данной работы явилось изучение физико-химических свойств липосом, приготовленных из фосфатидилхолина сои, свободных и инкапсулированных биополимерами (казеинатом натрия и его ковалентными конъюгатами с мальтодекстринами), а также дополнительно стабилизированных природными антиоксидантами растительного происхождения. Исследовали такие физико-химические свойства липосом, как микровязкость глубоколежащих областей липидного бислоя, а также размеры и форму липосом в зависимости от их взаимодействия как с растительными антиоксидантами, так и с биополимерами, используемыми для инкапсулирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные материалы. В работе использовали фосфатидилхолин (ФХ) фирмы Lipoid GmbH, Германия; мальтодекстрины SA-2 (декстрозный эквивалент (ДЭ = 2) и MD-10 (ДЭ = 10) фирмы AVEBE, Голландия; казеинат

натрия фирмы Sigma (Новая Зеландия); парамагнитный зонд 16-доксилстеариновую кислоту фирмы Sigma (США); органические растворители фирмы Merck (Германия). В качестве растительных антиоксидантов использовали эфирные масла имбиря, гвоздики, лимона, кориандра; экстракты душистого и черного перца, мяты, корицы фирмы Plant Lipids Ltd (Индия), антиокислительная активность которых была детально изучена в работах [13–18]. Все антиоксиданты вводили в липосомы в количестве 1% от веса ФХ.

Приготовление растворов. Растворы казеината натрия (1% вес/объем) и мальтодекстринов (ДЭ = 2 и 10) (2% вес/объем) готовили в фосфатном буфере (pH 7,0, $I = 0,001$ М, азид натрия – 0,02% вес/объем), перемешивая с помощью магнитной мешалки до полного растворения; центрифугировали (30 мин, 1800 g (4000 об/мин), 20°C).

Ковалентные конъюгаты: конъюгат 1 – казеинат натрия и мальтодекстрин (ДЕ = 2) и конъюгат 2 (ДЕ = 10) были сформированы по методу, описанному в работе [19]. Для этого водный раствор казеината натрия и мальтодекстрина (весовое соотношение 1 : 2 соответственно) лиофильно высушивали. Полученный лиофилизат прогревали в течение 72 ч в условиях постоянных температуры (60°C) и влажности (79%). Влажность поддерживали с помощью насыщенного раствора NaCl.

Приготовление липосом. Для приготовления липосом использовали раствор фосфатидилхолина в 10% этаноле (10^{-3} М) в фосфатном буфере (pH 7,0), смесь встряхивали в течение часа в шейкере-инкубаторе GFL 3032 (GFL, Germany). Полученные мицеллы подвергали диализу для удаления этанола в течение 24 ч против буферного раствора, используя Visking Dialysis Tubing (Type 36/32). Специальные эксперименты показали, что молекулы ФХ не переходят в раствор буфера при диализе. Остаточное количество этанола в растворе мицелл не превышало 0,5% по объему [8].

Полученные липосомы смешивали в соответствующей пропорции с приготовленными растворами казеината натрия и мальтодекстринов и встряхивали в шейкере в течение 1 ч при 40°C.

Метод спиновых зондов. Для характеристики структурного состояния мембран липосом использовали метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Параметры, характеризующие структуру мембран, рассчитывали из спектров, полученных при температуре 293 К на ЭПР-спектрометре Bruker 200D (Bruker, ФРГ) методом спинового зонда [20], в качестве

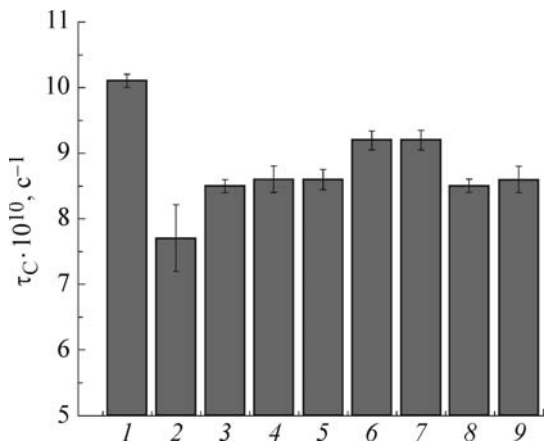


Рис. 1. Изменение времени вращательной корреляции зонда 16-доксилстеариновой кислоты в липосомах из ФХ при встраивании в липосомы различных антиоксидантов растительного происхождения. Приведены средние значения τ_C из пяти независимых экспериментов с тремя параллельными определениями данного параметра в каждом эксперименте. Среднее значение τ_C в экспериментах с каждым из антиоксидантов статистически достоверно отличается от τ_C в контроле ($p < 0,05$). 1 – ФХ (контроль), 2 – ФХ + экстракт имбиря, 3 – экстракт черного перца, 4 – эфирное масло гвоздики, 5 – экстракт мяты; 6 – эфирное масло кориандра, 7 – экстракт корицы, 8 – эфирное масло лимона, 9 – экстракт душистого перца (все – в количестве 1% от веса ФХ).

которого для изучения микровязкости глуболежащих областей липидного бислоя ($\sim 20 \text{ \AA}$) использовали 16-доксилстеариновую кислоту (C_{16}). Микровязкость мембраны в области локализации зонда C_{16} оценивали по временам вращательной корреляции зонда τ_{C_1} и τ_{C_2} , которые определяли по формулам для быстрого анизотропного вращения радикалов [20]:

$$\tau_{C_1} = 6,5\Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с,}$$

$$\tau_{C_2} = 6,65\Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_+}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с,}$$

где ΔH_+ и ΔH_0 – ширины низкочастотной и центральной компонент спектральной линии соответственно, а I_+ , I_0 и I_- – интенсивности низкочастотной, центральной и высокочастотной компонент спектра ЭПР. Так как при всех воздействиях количественный эффект по отношению как к τ_{C_1} , так и τ_{C_2} был абсолютно одинаковым, а величина τ_{C_1}/τ_{C_2} не изменялась, что говорит об отсутствии влияния исследуемых агентов на анизотропию вращения зонда C_{16} , то в дальнейшем для сравнения использовали

параметр τ_{C_2} , который будем называть τ_C . Измерения проводили в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН (группа ЭПР).

Метод атомно-силовой микроскопии. Размеры и форму липосом определяли методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Метод позволяет исследовать рельеф поверхности образца с разрешением порядка нескольких нанометров [21]. Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное острие, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Появление возвышенностей или впадин под острием приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера. Таким образом, регистрируя величину изгиба, можно сделать вывод о рельефе поверхности. Для регистрации изменения положения кантилевера на его внешнюю поверхность направляется луч лазера, который после отражения попадает в фотодетектор.

Для исследования образцов с малой механической жесткостью, таких как биологические объекты, в АСМ используется полуконтактный режим [21]. Кантилевер колеблется с определенной частотой, при этом зонд касается образца только в нижнем полупериоде колебаний. Сила, действующая со стороны поверхности, приводит к сдвигу амплитудно-частотной и фазово-частотной характеристик колебаний зонда, что позволяет анализировать поверхность, не повреждая ее.

АСМ-изображения липосом были получены с помощью атомно-силового микроскопа SOLVER P47 (SMENA, NT-MDT, Россия), в полуконтактном режиме на частоте колебаний 150 кГц, с использованием кантилевера NSG 11. Измерения производили с использованием воздушно-сухих пленок препарата [21]. Препараты перед измерением диализовали против бидистиллированной воды. Затем тонкие пленки водной суспензии липосом, биополимеров или их комплексов наносили на подложку из полированного кремния и высушивали на воздухе. После воздушной сушки при комнатной температуре поверхность образца на подложке кратковременно промывали бидистиллированной водой и снова высушивали. Размер сканируемой области составлял $20 \times 20 \text{ мкм}$. Полученные АСМ-изображения обрабатывали с помощью программы NT-MDT Image Analysis V. 2.2.0, позволяющей количественно оцени-

вать размеры и форму частиц [22] и получать большой статистический материал. Измерения проводили в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН (группа АСМ).

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки результатов использовали метод непараметрической статистики Манна–Уитни [23]. На графиках приведены средние значения исследуемых величин и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап нашей работы заключался в исследовании изменения физико-химических свойств липосом из ФХ под действием природных растительных антиоксидантов (эфирных масел и экстрактов). На рис. 1 представлены величины времен вращательной корреляции τ_C для липосом ФХ и липосом ФХ с встроенными в них антиоксидантами растительного происхождения. Видно, что все использованные антиоксиданты уменьшают этот параметр, эффект колеблется от 23% (для эфирного масла имбиря) до 8% (для эфирного масла кориандра и экстракта корицы), во всех случаях изменения были статистически достоверны для 95%-го доверительного интервала. Хотя химический состав эфирных масел и экстрактов существенно отличался, все они содержат фенолы или полифенолы [24–27]. Основным действующим веществом в эфирном масле гвоздики является фенол эвгенол [24], другие эфирные масла содержат тимол, карвакрол [25–27]; в экстракты пряно-ароматических растений входят каротиноиды, флавоноиды, антоцианы, фенольные кислоты, кумарины, танины, алкалоиды и большое число других соединений, обладающих антиокислительной и антирадикальной активностью, причем способность основных компонентов эфирных масел гвоздики, орегано, чабера, тимьяна и др. ингибировать окисление полиненасыщенных жирных кислот близка к эффективности α -токоферола или синтетических антиоксидантов [28,29]. В литературе мы не обнаружили исследований, касающихся конкретного действия этих соединений на структуру липосом или биомембран, поэтому мы можем провести сравнение только с эффектом «классического» антиоксиданта, каким является α -токоферол. В нескольких работах обнаружено увеличение текучести в глубоколежащих слоях липидов липосом, приготовленных из ФХ, содержащего жирные кислоты различной степени насыщенности [30,31] при воздействии α -токоферола; таким же свойством обладают и некоторые полифенолы [32]. То есть можно пола-

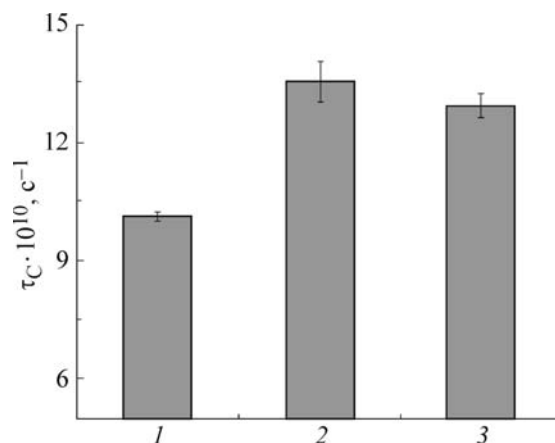


Рис. 2. Изменение времени вращательной корреляции зонда 16-доксилстеариновой кислоты в липосомах из ФХ при их комплексобразовании с различными биополимерами. Приведены средние значения τ_C из шести независимых экспериментов с тремя параллельными определениями данного параметра в каждом эксперименте. Среднее значение τ_C в экспериментах с каждым из биополимеров статистически достоверно отличается от τ_C в контроле ($p < 0,05$). 1 – ФХ (контроль), 2 – конъюгат 1, 3 – конъюгат 2.

гать, что и при введении в липосомы эфирных масел и растительных экстрактов также происходит взаимодействие их фенольных компонентов с жирнокислотными остатками фосфолипидных цепей, которое приводит к разжижению мембраны.

Как уже указывалось выше, молекулярный дизайн липосом, которые предлагается использовать в пищевых продуктах, предполагает применение помимо растительных антиоксидантов также и пищевых биополимеров, поэтому следующий шаг в наших экспериментах был связан с введением последних в растворы липосом и определением такого введения на их структуру. В экспериментах мы использовали основной белок молока, казеинат натрия; а также ковалентные конъюгаты казеината натрия и мальтодекстринов с разным декстрозным эквивалентом (1 и 2). На рис. 2 представлены данные об изменении параметра τ_C при комплексобразовании этих веществ с липосомами из ФХ. Оказалось, что казеинат натрия в используемой концентрации не влиял на эту величину, тогда как оба конъюгата увеличивали микровязкость липидного бислоя на 25–30%.

Однако на липосомы с встроенными в них антиоксидантами конъюгаты казеината натрия с мальтодекстринами, имеющими различный декстрозный эквивалент ($ДЭ = 2$ и 10), действуют неодинаково, хотя они оба увеличивают микровязкость как по сравнению с контроль-

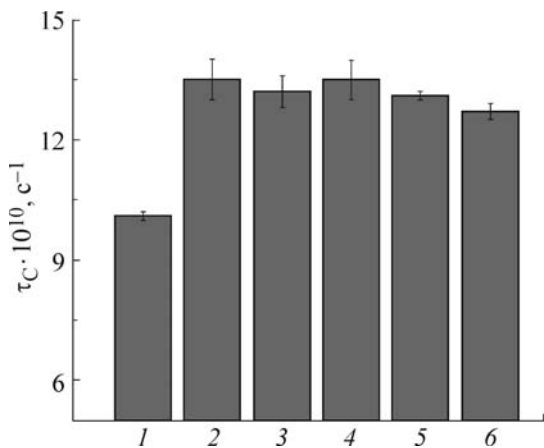


Рис. 3. Изменение времени вращательной корреляции зонда 16-доксилстеариновой кислоты в липосомах из ФХ при встраивании в липосомы различных антиоксидантов и их комплексообразования с конъюгатом 1. Приведены средние значения τ_c из четырех независимых экспериментов с тремя параллельными определениями данного параметра в каждом эксперименте. Среднее значение τ_c в экспериментах с каждым из антиоксидантов; конъюгатом 1; антиоксидантами и конъюгатом 1 статистически достоверно отличается от τ_c в контроле ($p < 0,05$). 1 – ФХ (контроль), 2 – ФХ + конъюгат 1, 3 – ФХ + конъюгат 1 + экстракт душистого перца, 4 – ФХ + конъюгат 1 + экстракт имбиря, 5 – ФХ + конъюгат 1 + экстракт черного перца, 6 – ФХ + конъюгат 1 + эфирное масло гвоздики.

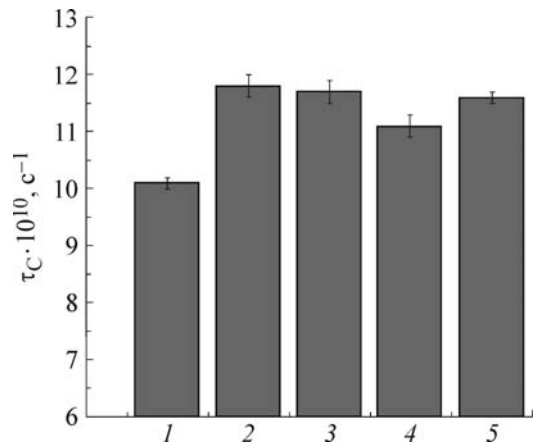


Рис. 4. Изменение времени вращательной корреляции зонда 16-доксилстеариновой кислоты в липосомах из ФХ при встраивании в липосомы различных антиоксидантов и их комплексообразования с конъюгатом 2. Приведены средние значения τ_c из четырех независимых экспериментов с тремя параллельными определениями данного параметра в каждом эксперименте. Среднее значение τ_c в экспериментах с каждым из антиоксидантов; конъюгатом 2; антиоксидантами и конъюгатом 2 статистически достоверно отличается от τ_c в контроле ($p < 0,05$). 1 – ФХ (контроль), 2 – ФХ + конъюгат 2, 3 – ФХ + конъюгат 2 + экстракт имбиря, 4 – ФХ + конъюгат 2 + экстракт черного перца, 5 – ФХ + конъюгат 2 + эфирное масло гвоздики.

ными липосомами из ФХ, так и, особенно значительно, по сравнению с липосомами, содержащими антиоксиданты (рис. 3 и 4). Во всех случаях действие конъюгата, объединяющего казеинат натрия с более длинноцепочечным мальтодекстрином – SA2 (ДЭ = 2) (рис. 3), в 1,5–2 раза больше, чем конъюгата MD 10 (ДЭ = 10) (рис. 4).

Таким образом, обобщая результаты по изменению микровязкости глубоколежащих областей липидного бислоя изученных липосом, можно сделать следующие выводы: растительные антиоксиданты уменьшают эту микровязкость, а инкапсулирование таких липосом в биополимеры не только компенсирует этот эффект, но и значительно увеличивает измеряемый физико-химический параметр. Полученный результат находится в соответствии с известными данными литературы как о влиянии белковой компоненты на микровязкость липидов [33], так и об изменении микровязкости глубоколежащих слоев липидов мембран, выделенных из тканей животных и растений при воздействии на них антиоксидантов *in vitro* [34–39].

Необходимо отметить, что усложнение состава липидов липосом [39–40] или использо-

вание в качестве моделей исследования мембран, выделенных их тканей животных (плазматических мембран, мембран эндоплазматического ретикулума и других), приводит к изменению характера ответа на введение антиоксидантов, а именно, микровязкость гидрофобных областей мембран увеличивается, что было отмечено и нами, и рядом других исследователей [36–40]. Эти различия заставляют с осторожностью относиться к перенесению результатов, полученных на липосомах из какого-либо одного фосфолипида, на мембраны, выделенные из живых объектов.

Ранее нами было установлено, что изменение в микровязкости липидного бислоя липосом, приготовленных из липидов, выделенных из плазматических мембран клеток печени, приводит к модификации размеров и формы исследуемых липосом [39–41]. Поэтому далее мы провели аналогичные эксперименты с липосомами из ФХ, модифицированными растительными антиоксидантами, а также пищевыми биополимерами, выбрав для исследований тот антиоксидант, который оказал наибольший эффект на параметр τ_c , а именно экстракт имбиря. Используя метод атомно-силовой микроскопии и применяя соответствующую программу об-

Влияние биополимеров и растительных антиоксидантов на размеры липосом из фосфатидилхолина

Проба	S , мкм ²	+/-	V , $\times 10^3$ мкм ³	+/-	Z , нм	+/-
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М, контроль), $n = 446$	0,1586	0,0268	16,533	4,08	68,082	3,6
Казеинат натрия	0,0535	0,0206	0,462	0,25	6,56	0,69
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) + 1% казеината натрия, $n = 79$	0,1145	0,0274	3,89	1,06	26,10	0,10
Конъюгат 1, $n = 1154$	0,0577	0,0010	0,896	0,13	12,48	0,15
Конъюгат 2, $n = 663$	0,0532	0,0011	0,547	0,06	11,17	0,09
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) + конъюгат 1, $n = 637$	0,2467	0,0250	4,98	0,94	14,06	0,26
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) + конъюгат 2, $n = 347$	0,1879	0,0230	3,23	0,55	13,55	0,36
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) + экстракт имбиря, $n = 613$	0,6681	0,1948	53,102	16,17	64,88	1,94
ФХ ($2 \cdot 10^{-3}$ М) + экстракт имбиря + казеинат натрия, $n = 557$	0,2379	0,0083	13,551	5,58	45,23	2,92

Примечание. Приведены средние значения из n (число изученных частиц) и средние квадратичные отклонения.

счета полученных изображений, о которых было более подробно изложено выше, мы получили такие количественные характеристики индивидуальных липосом, как среднюю площадь сечения (S), объем (V) и высоту (Z). Их величины приведены в таблице. Из таблицы следует, что исследуемый экстракт статистически достоверно увеличивает среднюю площадь сечения и объем каждой индивидуальной липосомы, что согласуется с их влиянием на микровязкость (рис. 1): становясь более «жидкими», липиды занимают больший объем. Также эти результаты находятся в соответствии с данными работы [42], авторы которой установили, что встраивание в липосомы экстрактов семян винограда или гибискуса, обладающих антиоксидантным эффектом, увеличивает средний диаметр липосом. Средняя высота липосом при этом меняется незначительно.

Комплексообразование липосом с казеинатом натрия или ковалентными конъюгатами на его основе, наоборот, приводит к существенному уменьшению параметров S и V (таблица). Этот эффект также хорошо коррелирует с изменением микровязкости липидов: конъюгаты 1 и 2 увеличивают микровязкость приблизительно на 30% и уменьшают указанные параметры почти в три раза. При этом уменьшается и средняя высота каждой липосомы. Таким образом, биополимеры очень сильно уплотняют липосому, что было установлено в нашей предыдущей работе независимыми экспериментами [8]. Таким образом, мы установили, что и размеры, и форма липосом существенно меняются как при введении в липосомы антиоксидантов, так и при комплексовании липосом с биополимерами. Каково совместное действие

антиоксиданта и биополимера на эти показатели?

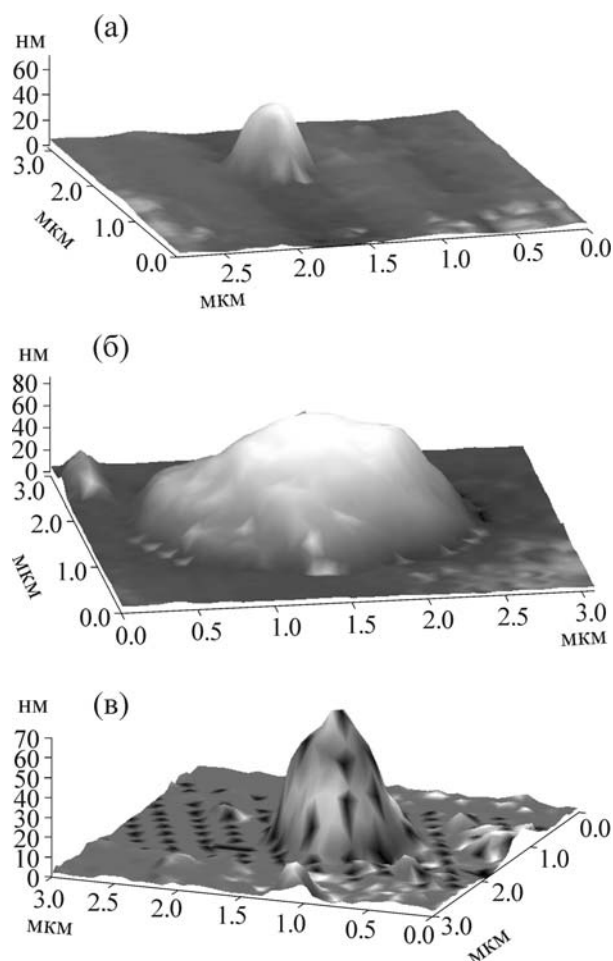


Рис. 5. АСМ-изображения единичных липосом из ФХ (а); ФХ + экстракт имбиря (б); ФХ + экстракт имбиря + казеинат натрия (в).

Мы постарались получить ответ на этот вопрос путем введения в липосомы экстракта имбиря и последующего формирования комплексов таких липосом с казеинатом натрия (таблица, рис. 5). Как следует из таблицы, комплексообразование с казеинатом натрия липосом ФХ, модифицированных экстрактом имбиря, приводит к нивелированию увеличения показателей S и V липосом, практически возвращая измеряемые параметры к исходным значениям для контрольных липосом, приготовленных из чистого ФХ. Липосомы, нагруженные казеинатом натрия либо конъюгатами 1 или 2, имеют площадь сечения и объем, в несколько раз превышающих таковые как у контрольных липосом, так и полимерных глобул; наибольшие значения обнаружены при нагрузке липосом конъюгатом 1. Аналогичные изменения происходят и с таким параметром, как средняя высота липосом, адсорбированных на кремниевой поверхности (см. таблицу). Следует подчеркнуть, что все наблюдаемые различия получены на большом статистическом материале (см. таблицу) и достоверны для 95%-го доверительного интервала.

Особенно наглядно эти превращения демонстрируются на соответствующих имиджах-моделях единичных липосом (рис. 5). На рисунке хорошо видно, что исходная липосома из ФХ имеет вид конуса (рис. 5а), введение экстракта имбиря существенно увеличивает ее размеры и придает асимметричную форму (рис. 5б), и, наконец, комплексообразование с казеинатом натрия уплотняет ее, вновь приближая к исходной контрольной конусообразной частице, которая все-таки по размерам превышает контрольные липосомы на 25–30%, но становится более компактной и плотной по сравнению с липосомой из ФХ с добавкой растительного антиоксиданта (рис. 5в).

Таким образом, мы можем сделать заключение, что растительные антиоксиданты уменьшают микровязкость глубоколежащих областей липидного бислоя липосом из ФХ, тогда как комплексообразование липосом, модифицированных антиоксидантами, с молекулами биополимеров (белка или ковалентных конъюгатов), напротив, приводит к значительному увеличению микровязкости глубоколежащих областей липидного бислоя таких липосом.

Растительные антиоксиданты (экстракт имбиря), увеличивают площадь сечения и объем контрольных липосом из ФХ, в то время как комплексообразование с биополимерами (белком и ковалентными конъюгатами) уменьшает их, что находится в соответствии с данными, имеющимися в литературе [42]. Ранее нами было

показано, что такое уменьшение сопровождается значительным возрастанием плотности комплексных частиц (биополимер + липосомы из ФХ), по сравнению с частицами чистых биополимеров [8]. Кроме того, комплексообразование липосом, модифицированных экстрактом имбиря, с белком (казеинатом натрия) приводит к нивелированию первичного эффекта антиоксиданта (экстракта имбиря), уменьшая его. Найденные нами закономерности во влиянии растительных антиоксидантов и пищевых биополимеров на физико-химические свойства липосом из ФХ могут быть использованы для разработки на их основе систем доставки нутрицевтиков или лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-16-00102); в рамках работ по госбюджетному финансированию В.И. Бинюков и В.В. Каспаров выполняли исследования как операторы в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН (группы атомно-силовой микроскопии и ЭПР соответственно).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Донелли, Д. Ренсли и Н. Рид, *Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний* (Мир, М., 2004).
2. D. J. McClements, *Nanoparticle – and Microparticle-based Delivery Systems: Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds* (CRC Press Taylor and Francis Group, New York, 2014).
3. M. G. Semenova and E. Dickinson, *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions* (Brill, Leiden, 2010).
4. M. Phang and M. Garg, M., in *Food structures, digestion and health*, Ed by M. Boland, M. Golding, and H. Singh (Elsevier Academic Press, London, 2014), pp. 437–463.
5. M. Gibis, N. Rahn, and J. Weiss, *Pharmaceutics* **5**, 421 (2013)
6. D. J. McClements and E. A. Decker, *J. Food Sci.* **65**, 1270 (2000).
7. M. G. Semenova, A. S. Antipova, L. E. Belyakova, et al., *Food Hydrocolloids* **42**, 149 (2014).
8. M. G. Semenova, D. V. Zelikina, A. S. Antipova, et al., *Food Hydrocolloids* **52**, 144 (2015).
9. Ch. Tan, Ya. Zhang, Sh. Abbas, et al., *Food Funct.* **6**, 3702 (2015).
10. V. A. de Oliveira Tiera, F. M. Winnik, M. J. Tiera, *J. Thermal Analysis and Calorimetry* **100**, 309 (2010).
11. M. G. Semenova, M. S. Anokhina, A. S. Antipova, et al., *Food Hydrocolloids* **34**, 22 (2014).
12. S. R. Wassall, M. Caffrey, V. Cherezov, et al., *Chemistry and Physics of Lipids* **132**, 79 (2004).
13. M. T. Baratta, H. J. D. Dorman, S. G. Deans, et al., *Flavour Fragr. J.* **13**, 235 (1998).

14. Е. Б. Бурлакова, Т. А. Мишарина, А. К. Воробьева и др., Докл. РАН **444** (6), 676 (2012).
15. М. Б. Теренина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова и др., Прикл. биохимия и микробиология **47** (4), 490 (2011).
16. Е. С. Алинкина, Т. А. Мишарина, Л. Д. Фаткуллина и др., Прикл. биохимия и микробиология **48** (4), 450 (2012).
17. Т. А. Мишарина, Л. Д. Фаткуллина, Е. С. Алинкина и др., Прикл. биохимия и микробиология **50** (1), 1 (2014).
18. P. Strugała, S. Cyboran-Mikołajczyk, A. Dudra, et al., J. Membrane Biol. **249**, 393 (2016)
19. J. O'Regan and D. M. Mulvihill, Food Chemistry **115**, 1257 (2009).
20. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
21. D. J. Muller and Y. F. Dufrene, Nat. Nanotechnol., № 3, 261 (2008).
22. В. И. Бинюков, О. М. Алексеева, Е. М. Мильи др., Докл. РАН **441** (1), 114 (2011).
23. Н. Бейли, *Математика в биологии и медицине* (Наука, М., 1970).
24. А. R. Koroch, H. R. Juliani, and J. A. Zygadlo, *Bioactivity of essential oils and components. Flavour and Fragrances* (Springer, New York, 2007).
25. K. G. Lee and T. Shibamoto, J. Agric. Food Chem. **50**, 4947 (2002).
26. L. Jirovetz, G. Buchbauer, I. Stollova, et al., J. Agric. Food Chem. **54**, 6303 (2006).
27. Т. А. Мишарина, Е. С. Алинкина, М. Б. Теренина и др., Прикл. биохимия и микробиология **51** (1), 1 (2015)
28. G. Ruberto and M. T. Baratta, Food Chem. **69**, 167 (2000)
29. T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, and M. Milos, Food Chem. **85**, 633 (2004)
30. W. Stillwel, W. Ehringer, and S. R. Wassall, Biochim. Biophys. Acta **110**, 237 (1992).
31. E. Severcan and S. Cannistraro, Chem. Phys. Lipids **53**, 17 (1990).
32. Н. Т. Т. Phan, Т. Yoda, В. Chahal, et al., Biochim. Biophys. Acta **1828**, 2670 (2014).
33. О. Гриффит и П. Джост, *Метод спиновых меток. Теория и применение* (Мир, М., 1979).
34. Yu. Gubskii, A. E. Boldescul, R. G. Primak, and O. V. Zadorina, Ukr. Biochim.Zh. **61**, 94 (1989).
35. P. K. Ghost, A. Vasani, G. Murugesan, et al., Nat. Cell. Biol. **4**, 894 (2002)
36. В. В. Белов, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, Биофизика **52** (1), 75 (2007).
37. В. В. Белов, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, Биофизика **56** (2), 376 (2011)
38. Т. Е. Часовская, Е. Л. Мальцева и Н. П. Пальмина, Биофизика **58** (1), 97 (2013).
39. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева и Т. Е. Часовская, Биофизика **59** (4), 704 (2014).
40. Т. Е. Часовская, И. Г. Плащина и Н. П. Пальмина, Докл. РАН, **449** (6) 673 (2013).
41. Н. П. Пальмина, Т. Е. Часовская, В. И. Бинюков и И. Г. Плащина, в сб. *Высокореакционные интермедиаты*, под ред. М. А. Егорова и М. Я. Мельникова (МГУ, М., 2014), сс. 51–78.
42. G. Yang, H. Wang, Y. Kanga, and M.-J. Zhu, Food Funct. **5**, 2558 (2014).

Structural State and Form of Free and Biopolymer-Encapsulated Phosphatidylcholine Liposomes in the Absence and Presence of Natural Plant Antioxidants

N.P. Palmina, E.L. Maltseva, V.I. Binyukov, V.V. Kasparov,
A.S. Antipova, and M.G. Semenova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

Using ESR and atomic force spectroscopy, we have studied liposomes prepared from soybean phosphatidylcholine with the incorporated plant antioxidants (extracts from ginger, allspice and black pepper, pimento) and encapsulated in biopolymers (sodium caseinate or the sodium caseinate-maltodextrin covalent conjugates). With ESR and 16-doxy stearic acid spin probe we have found that plant antioxidants decreased microviscosity of the deep-lying regions of the lipid bilayer of liposomes by 15–25%. Ginger extract exerted the highest effect (24%). Sodium caseinate and the sodium caseinate-maltodextrin covalent conjugates (using maltodextrins of dextrose equivalents such as 2 and 10) caused a 30–35% increase in microviscosity in regard both to free liposomes and liposomes with antioxidants. Using atomic force microscopy, we have shown that the incorporation of antioxidants leads to an increase in the area of cross-section and the volume of liposomes, and encapsulation in polymers results in liposome thickness and the formation of more compact structure.

Keywords: phosphatidylcholine liposomes, plant antioxidants, lipid microviscosity, atomic force microscopy, biopolymers