

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-74

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С АНТИМИКРОБНЫМ ПЕПТИДОМ CHBAC3.4**ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE CHBAC3.4**

А.Ю. Евстратова¹, Е.Я. Минаев¹, Н.С. Шастина¹, О.А. Баранова², А.В. Чеканов², Д.В. Товпеко³, А.С. Комлев⁴, М.С. Сухарева⁴, Е.В. Владимирова⁴, Э.Ю. Соловьева², А.И. Федин², В.А. Щелконогов^{1,2}

¹МИРЭА — Российский технологический университет, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

⁴Институт экстремальной медицины, Санкт-Петербург

A.Yu. Evstratova¹, E.Ya. Minaev¹, N.S. Shastina¹, O.A. Baranova², A.V. Chekanov², D.V. Tovpeko³, A.S. Komlev⁴, M.S. Sukhareva⁴, E.V. Vladimirova⁴, E.Yu. Solovyeva², A.I. Fedin², V.A. Shchelkonogov^{1,2}

¹MIREA — Russian Technological University, Moscow

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

³S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

⁴Institute of Extreme Medicine, Saint Petersburg

E-mail: evstratova.anastasya.8@yandex.ru

Аннотация

Получены липосомы (Лс) с антимикробным пептидом ChBac3.4, с размером частиц в диапазоне 140–210 нм, характеризующиеся высокой степенью включения в наночастицы (НЧ) независимо от pH среды и дисперсионной стабильностью при длительном хранении при T +4 °C. Продемонстрировано, что Лс с ChBac3.4 обладают выраженными антиоксидантными свойствами.

Abstract

Liposomes (Lc) with antimicrobial peptide ChBac3.4, with a particle size of 140–210 nm were obtained, characterized by a high encapsulation efficiency in nanoparticles (NPs) regardless of the pH of the medium and dispersion stability during long-term storage at T +4 °C. It has been demonstrated that Lc with ChBac3.4 have pronounced antioxidant properties.

Сосудистые заболевания головного мозга являются серьезными и распространенными патологиями центральной нервной системы, часто приводящими к летальным исходам. Ишемический процесс — ключевой фактор протекания многих патологических реакций в головном мозге. В основе таких биохимических реакций лежит «оксидативный стресс». Оксидативный стресс характеризуется чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к повреждению и гибели нейронов головного мозга. Таким образом, при комплексной терапии данной патологии важно использовать препараты, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Антимикробный пептид (АМП) ChBac3.4 представляет собой богатый пролином и аргинином пептид, который обладает широким спектром биологических свойств от бактерицидного действия до участия в процессах регенерации. Однако при систематическом введении ChBac3.4 возникает ряд проблем, таких как высокая цитотоксичность, нежелательные побочные эффекты и быстрая биодеградация в организме.

Поэтому целью исследования является получение липосом с антимикробным пептидом ChBac3.4 для защиты его от биодеградации, пролонгированного действия, а также исследование биологической активности на модельных системах.

Первоначально получали фосфатидилхолиновые (ФХ) липосомы с ChBac3.4 методом гидратации липидной пленки, диспергируя ее фосфатным буферным (ФБР, pH 7,4) или физиологическим (pH 5,7) растворами, содержащими пептид, с последующей экструзией.

Таким образом были получены ФХ-липосомы с ChBac3.4 с размером частиц в диапазоне от 140 до 210 нм. Степень включения активной субстанции в Лс варьировалась от 60 до 95 % в зависимости от концентрации активной субстанции (0,3–0,6 мг/мл). Необходимо отметить, что эффективность включения АМП в Лс не зависела от pH среды. Было показано, что НЧ с ChBac3.4 были гомогенными, электронейтральными и дисперсионно ста-

бильными при длительном хранении (более 10 мес.) при $T +4^{\circ}\text{C}$. Также было обнаружено, что за 3 дня высвободилось около $60 \pm 10\%$ ChBac3.4 из наночастиц, что позволяет судить о пролонгированном действии.

Для оценки антиоксидантной активности Лс с ChBac3.4 был проведен тест с использованием стабильного DPPH-радикала. При добавлении Лс с ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) наблюдалось выраженное снижение концентрации DPPH-радикала, свидетельствующее о его восстановлении. В ходе эксперимента было установлено, что Лс с ChBac3.4 обеспечивали ингибицию DPPH-радикала в пределах 64–72 %, что указывает на выраженные антиоксидантные свойства данных липосом с АМП. Стоит отметить, что «пустые» Лс и водные растворы ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) также обладают антиоксидантным эффектом (ингибиция DPPH-радикала — 46–56 %).

Одними из форменных элементов крови являются нейтрофилы, способные генерировать активные формы кислорода (АФК) в присутствии различных активаторов или при воспалительных процессах. В данной работе оценивалось антиоксидантное действие липосом с ChBac3.4 на активированных нейтрофилах в сравнении с водным раствором пептида и «пустых» Лс. Активацию нейтрофилов обуславливали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА).

В результате проведенных исследований было показано, что добавление ФМА к нативным нейтрофилам (контроль) приводило к увеличению интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов по сравнению с интактными клетками. Добавление Лс с ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) приводило к значительному уменьшению (примерно 6–32 раза) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной протеканием свободно-радикальных процессов в нейтрофилах, активированных с помощью ФМА, по сравнению с контролем. Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали Лс с ChBac3.4 при использовании максимально исследуемой концентрации пептида. Водный раствор ChBac3.4 (3,5–10,5 мкМ) и «пустые» липосомы также проявляли антиоксидантные свойства в выбранной клеточной модели, снижая концентрацию АФК примерно в 2 раза.

Таким образом, липосомы с ChBac3.4 являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vitro*.