

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМ С ИНКАПСУЛИРОВАННЫМ КАРДИОПРОТЕКТОРОМ, ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ *IN VIVO*

Никифоров А. И.^{1,2}, Шульмейстер Г. А.¹, Истомина М. С.^{1,2},
Королев Д. В.^{1,3}, Мурин И. В.⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Институт химии, Санкт-Петербург,
Россия

Контактная информация:

Королев Дмитрий Владимирович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
пр. Пархоменко, д. 15, лит. Б, Санкт-
Петербург, Россия, 194156.
E-mail: dimon@cardioprotect.spb.ru

Статья поступила в редакцию 02.09.2024
и принята к печати 17.12.2024

Резюме

Актуальность. Липосомальные системы доставки лекарств находят все большее применение в клинической практике благодаря их способности улучшать фармакокинетический профиль и снижать системную токсичность препаратов. Квинакрин является перспективным препаратом с доказанной кардиопротекторной и противовирусной активностью, однако его использование ограничено побочными эффектами. Разработка липосомальной формы квинакрин (QLPS) может позволить преодолеть эти ограничения и повысить эффективность таргетной доставки. **Цель.** Изучение физико-химических свойств синтезированного липосомального квинакрин с различной концентрацией фосфолипидов, кинетики высвобождения действующего вещества и биораспределения *in vivo*. **Материалы и методы.** Использовались коммерчески доступные реактивы: фосфолипиды, холестерин, витамин Е. Физико-химические характеристики липосом (гидродинамический диаметр, полидисперсность, дзета-потенциал) исследовались с помощью метода координатного рассеяния света. Морфология липосом изучалась при помощи просвечивающей электронной микроскопии. Исследование биораспределения проводилось на лабораторных мышах с использованием метода флуоресцентной визуализации *in vivo*. **Результаты.** В ходе работы исследованы физико-химические характеристики липосом, выполнено сравнение двух

образцов с различной концентрацией фосфолипидов, описан их профиль высвобождения и биораспределение. **Заключение.** Разработанный липосомальный квинакрин обладает оптимальными физико-химическими характеристиками. Полученные данные о профилях высвобождения действующего вещества и особенностях биораспределения *in vivo* являются основой для дальнейшей разработки эффективных и безопасных препаратов на этой платформе.

Ключевые слова: биораспределение, доставка лекарств, квинакрин, кинетика высвобождения, липосомы, наночастицы

Для цитирования: Никифоров А.И., Шульмейстер Г.А., Истомина М.С. и др. Получение липосом с инкапсулированным кардиопротектором, исследование физико-химических свойств, кинетики высвобождения и биораспределения *in vivo*. Трансляционная медицина. 2025; 12(3): 256-267. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-3-256-267. EDN: OSPQRW

MAKING OF LIPOSOMES WITH ENCAPSULATED CARDIOPROTECTOR, STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, RELEASE KINETICS AND BIODISTRIBUTION *IN VIVO*

Alexey I. Nikiforov^{1,2}, Galina A. Shulmeyster¹, Maria S. Istomina^{1,2},
Dmitry V. Korolev^{1,3}, Igor V. Murin⁴

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State University, Institute of Chemistry, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Dmitry V. Korolev,
Almazov National Medical Research Centre,
Parchomenko ave., 15 B, Saint Petersburg,
Russia, 194156.
E-mail: dimon@cardioprotect.spb.ru

Received 02 September 2024; accepted
17 December 2024

Abstract

Background. Liposomal drug delivery systems are increasingly used in clinical practice due to their ability to improve the pharmacokinetic profile and reduce the systemic toxicity of drugs. Quinacrine is a promising drug with proven cardioprotective and antiviral activity, however, its use is limited by side effects. The development of a liposomal form of quinacrine (QLPS) can overcome these limitations and increase the efficiency of targeted delivery. **Objective.** To study the physicochemical properties of synthesized liposomal quinacrine with different concentrations of phospholipids, the kinetics of the release of the active substance and biodistribution *in vivo*. **Design and method.** Commercially available reagents were used: phospholipids, cholesterol, vitamin E. The physicochemical characteristics of liposomes (hydrodynamic diameter, polydispersity, zeta potential) were studied using the coordination light scattering method. The morphology of liposomes was studied using transmission electron microscopy. The biodistribution study was carried out on laboratory mice using *in vivo* fluorescence imaging. **Results.** In the course of the work, the physicochemical characteristics of liposomes were studied, two samples with different concentrations of phospholipids were compared, their release profile and biodistribution were described. **Conclusion.** The developed liposomal quinacrine has optimal physicochemical characteristics. The obtained data on the active substance release profiles and the features of biodistribution *in vivo* are the basis for the further development of effective and safe drugs on this platform.

Key words: biodistribution, drug delivery, liposomes, nanoparticles, quinacrine, release kinetics

For citation: Nikiforov AI, Shulmeister GA, Istomina MS, et al. Preparation of liposomes with an encapsulated cardioprotector; study of physicochemical properties, release kinetics and biodistribution in vivo. Translation- al Medicine. 2025; 12(3): 256-267. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-3-256-267. EDN: OSPQRW

Список сокращений: ДВ — действующее вещество, ИПД — индекс полидисперсности, ИЦЗ — индоцианин зеленый, ЛПС — липосомы, ФЛП — фосфолипиды, ХС — холестерин, DLS — динамическое рассеяние света, ELS — электрофоретическое рассеяние света, QLPS — липосомы с инкапсулированным квинакрином.

Введение

В настоящее время существует высокий спрос на системы доставки лекарств, которые обеспечат высокую эффективность и низкую токсичность [1]. Использование для этого различных наночастиц является весьма перспективным направлением исследований, так как их можно применять для доставки лекарств с низкой биодоступностью и необычным биологическим распределением [2]. В качестве такой системы можно использовать липосомы (ЛПС), что позволит осуществлять доставку препарата [3], уменьшить побочные действия за счет меньшего распределения действующего вещества (ДВ) в организме [4], а также существенно пролонгировать эффект от ДВ. Помимо этого, фосфолипиды по своей природе амфифильны, что позволяет инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные препараты. При этом гидрофильные действующие вещества включаются в водное ядро, а гидрофобные — в фосфолипидную оболочку [5]. Также благодаря своему строению ЛПС биосовместимы и обладают хорошей текучестью и гибкостью. Их можно значительно модифицировать, присоединяя различные лиганды, добавляя в состав разные химические вещества, таким образом значительно меняя их характеристики и адаптируя под различные цели.

Достаточно большое количество липосомальных препаратов проходят клинические испытания. Первым образцом, одобренным для использования в странах Европы и США, является липосомальный доксорубин. Его используют для лечения таких заболеваний, как саркома Капоши и рецидивирующий рак яичников [6, 7]. ЛПС также действуют для доставки различных витаминов, например, витамина В12. При исследованиях было показано, что такой способ применения витамина В12 демонстрирует высокую эффективность за до-

статочно короткий промежуток времени, что в некоторых случаях является очень важной характеристикой [8]. Также была испытана липосомальная форма витамина С [9]. Исследования показали, что она имеет ряд преимуществ перед традиционной формой. Это, к примеру, ускоренное всасывание в кишечнике, более высокая стабильность, защита кишечника от потенциально раздражающих агентов и высокая биодоступность. Кроме различных витаминов исследовались также и другие минералы, например, магний. Согласно исследованию [10], липосомальный магний имел более высокую биосовместимость по сравнению с традиционными формами, применяемыми для доставки магния (хелат, бисглицинат).

В статье [11] сообщается об оценке терапевтического потенциала липосомы, нацеленной на митохондрии миокарда. В качестве действующего вещества при этом используется ресвератрол, природное полифенольное соединение с кардиопротекторным действием. Улучшена кардиопротекторная эффективность верапамила за счет повышения биодоступности с помощью инкапсуляции в ЛПС [12]. Кардиопротекторный эффект подтвержден гистопатологическими исследованиями. Фармакокинетические исследования показали улучшение биодоступности по сравнению со свободными препаратами.

Квинакрин — лекарственный препарат, обладающий и флуоресцентными, и кардиопротекторными свойствами. Представляет собой кристаллический порошок желтого цвета. Квинакрин был синтезирован в 30-х годах 20-го века как флуоресцентный краситель. Вскоре была обнаружена его противомаларийная и антипаразитарная активность [13]. В последние несколько десятилетий появились статьи, показывающие способность квинакрин положительно влиять на постишемическое восстановление миокарда [14, 15]. В настоящее время обнаружена активность квинакрин против коронавируса COVID-19 [16–20].

В работе синтезируемый препарат липосомального квинакрин позиционируется как средство пассивной направленной доставки в ишемизированный миокард за счет разницы проницаемости сосудов здоровой и ишемизированной тканей для

его защиты от ишемического и реперфузионного повреждения, что приводит к уменьшению размера инфаркта [21].

Целью данного исследования был синтез ЛПС с инкапсулированным квинакрином (QLPS) в различных условиях, а также изучение физико-химических характеристик полученных липосом и кинетики высвобождения действующего вещества. Принципиально было выбрано одно действующее вещество и указан один вид постобработки, ввиду ограниченности исследования.

Материалы и методы

В качестве действующего вещества в работе был использован квинакрин марки Quinacrine dihydrochloride $\geq 90\%$ (Sigma-Aldrich, Германия).

В качестве компонентов липидной пленки ЛПС применяли фосфолипид (ФЛП) фосфотидилхолин L- α -Phosphatidylcholine 14–29 % (Sigma-Aldrich, Германия). Для упрочнения липидной мембраны использовался холестерин $\geq 92,5\%$ (Sigma-Aldrich, Германия). Предотвращение окисления и химическую стойкость обеспечивал альфа-токоферола ацетат (витамин E) DL- α -Tocopherolacetate (Sigma-Aldrich, Германия).

Для синтеза ЛПС в работе использовался метод гидратации тонких пленок. Сущность метода заключалась в упаривании раствора фосфолипидов на стенках круглодонной колбы для получения тонкой пленки при помощи ротационного испарителя. Далее полученную пленку сушили и подвергали гидратации водным раствором квинакрина концентрацией 1 мг/мл. В пленку также включался холестерин (ХС) для придания жесткости в структуре [29] и для повышения плотности упаковки ФЛП [30]. При синтезе использовались две концентрации фосфолипидов: 5 мг/мл и 20 мг/мл. Молярное соотношение ФЛП:ХС составляло 5:1. При различных концентрациях фосфолипидов метод синтеза не изменялся.

При синтезе липосомального квинакрина с концентрацией ФЛП 20 мг/мл реактивы в количестве 300 мг ФЛП и 75 мг ХС помещались в круглодонную колбу объемом 1000 мл и заливались 15 мл хлороформа при перемешивании. Для предотвращения окисления липидов добавлялся α -токоферола ацетат (витамин E) в количестве 30 мкл. Растворитель упаривали на ротационном испарителе (RE-5000 Rotary Evaporator, China) при скорости вращения 35 мин⁻¹ под вакуумом (Labport N 810, KNF, Germany) без нагревания до образования тонкой пленки. Затем пленку досушивали при температуре водяной бани $35 \pm 5^\circ\text{C}$ до состо-

яния прозрачности в течение 50 минут. Параллельно готовился водно-спиртовой гидратирующий раствор квинакрина, который затем вводился в колбу для формирования ЛПС. Растворяли 15 мг квинакрина в 15 мл смеси этилового спирта и дистиллированной воды с соотношением 1:1. После окончания формирования пленки гидратирующий раствор вводился в колбу, и происходило формирование «больших» ЛПС с включенным в них квинакрином.

Для прослеживания пути распространения QLPS в кровотоке животного в гидратирующий раствор добавляли индоцианин зеленый (ИЦЗ) в концентрации 1 мг/мл.

С целью получения однослойных нано-ЛПС применялся ультразвук. Для этого полученные на первом этапе ЛПС подвергали воздействию ультразвука с помощью прибора УЗГ13-0,1/22 (НИИ ТВЧ, Россия). Частота ультразвука составляла 20 кГц, время обработки — 15 минут.

Готовую суспензию ЛПС переливали в коническую полипропиленовую пробирку емкостью 50 мл и хранили в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$ до дальнейшего использования.

Для замены растворителя (этанол + вода) на физиологический раствор применялся метод диализа. Использовались диализные мешки с пористостью 12–14 кДа. Диализ проводился в 2-литровом химическом стакане 2 раза против дистиллированной воды и 2 раза против физиологического раствора. Время каждого диализа составляло 1 час при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке (200 мин⁻¹).

В первом диализате не было обнаружено свободного квинакрина, из чего можно сделать вывод о его 100 % инкапсуляции.

Метод синтеза с концентрацией фосфолипидов 5 мг/мл полностью аналогичен методу, описанному выше, за исключением соотношения реагентов. Использовались 75 мг фосфолипидов, 15 мг холестерина, 15 мл хлороформа в качестве растворителя и 10 мкл α -токоферола ацетата. Для гидратации пленки вместо водно-спиртового раствора применялся физиологический раствор.

Распределение по размерам и дзета-потенциал ЛПС изучали в водной среде при помощи метода динамического рассеяния света (Dynamic Light Scattering — DLS) и метода электрофоретического рассеяния света (ELS — Electrophoretic Light Scattering) соответственно с помощью прибора Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Использовались следующие параметры прибора. DLS: время накопления корреляционной функции составляло 120 секунд, распределение по размерам

измерялось в трех повторностях, температура образца составляла 25°C, использовался метод анализа General Purpose, ELS: температура 25°C, Analysis model — Auto Mode. Дополнительные настройки были выставлены по умолчанию. Обеспыливание коллоидного раствора не проводилось. За средний гидродинамический размер принималось значение Z-average, которое рассчитывалось по первичным данным Size Distribution Intensity.

Спектрофотометрические характеристики материалов определялись при помощи спектрофотометра Unico 2802s (UnicoSys, USA).

Микрофотографии «больших» многослойных ЛПС были получены при помощи светового микроскопа Nikon Microscope Eclipse E200 (Japan).

Морфология нанолипосом изучалась при помощи Transmission Electron Microscope HT7800 Series (Hitachi, Japan). Использованы подложки Nickel Grids Formvar Support Films 200 Mesh (Zongjingkei Technology, China).

Для определения количества квинакрина использовался спектрофотометрический метод. Построение калибровочной зависимости оптической плотности раствора от концентрации делали для проб с содержанием квинакрина 0,0039, 0,0043, 0,0049, 0,0056, 0,0065, 0,0078 и строили калибровочную зависимость, по которой затем определяли количество вещества в пробах.

Для построения калибровочной зависимости степени поглощения от концентрации действующего вещества исследовался спектр поглощения водного раствора квинакрина и определялись максимумы полос поглощения. Спектр поглощения показал, что водный раствор квинакрина имеет три полосы поглощения: 273, 424 и 444 нм. Наиболее интенсивное поглощение наблюдается при 273 нм. Калибровка и дальнейшие измерения проводились именно на этой полосе поглощения.

Профиль высвобождения действующего вещества — квинакрина, изучался следующим образом. Образец QLPS с инкапсулированным квинакрином объемом 15 мл помещался в диализный мешок с диаметром пор 12–14 кДа, шириной 33 мм, длиной 120 мм. Края мешка фиксировались стандартными зажимами. Собранный мешок помещали в полипропиленовый стакан объемом 1000 мл, в который заливали 500 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) с pH = 7,4. Образец перемешивался на магнитной мешалке со скоростью 150 с⁻¹. Проводился периодический отбор проб в объеме 2 мл. Этот объем компенсировался PBS буфером. Отобранная проба анализировалась спектрофотометрически.

Уровень световой отдачи образцов QLPS, меченных ИЦЗ, *in vivo* на биомоделях исследовался

методом флуоресцентной визуализации на флуоресцентном томографе IVIS Lumina LT Series III (PerkinElmer, USA). Прибор имел встроенные фильтры для ИЦЗ с максимумом длины волны поглощения 745 нм и испускания 820 нм.

Для мониторинга биораспределения и накопления QLPS, меченных ИЦЗ, *in vivo* во времени использовались крысы стока Wistar, массой 270 г ± 10 %. Предварительно животных вводили в наркоз 5 % наркозом на основе изофлурана (Аерран, Baxter) в боксе предварительной подготовки. Затем животные были помещены в камеру, где на протяжении всего периода визуализации подвергались индивидуальному масочному 1,5 % наркозу с помощью интегрированной анестезиологической магистрали. Температура тела животных во время съемки поддерживалась на уровне 37 °C. Детекция флуоресцентного свечения проводилась непосредственно сразу после введения препарата, на 5-й и 10-й минутах. Вводился 1 мл QLPS, меченных ИЦЗ, в хвостовую вену крыс. Для сравнения: аналогичное количество ИЦЗ, растворенного в физиологическом растворе (0,9 % NaCl), было введено второму животному. В качестве контроля и для вычитания фонового сигнала автофлуоресценции в экспериментах было задействовано интактное животное, которому внутривенно вводили 1 мл 0,9 % NaCl. Визуализация осуществлялась при следующих настройках аппаратуры: binning — 2, exposition — auto.

Эксперимент для каждой группы (QLPS-ИЦЗ, свободный ИЦЗ) проводился трехкратно. Группа состояла из одного экспериментального и одного контрольного животного.

Результаты и обсуждение

Для получения QLPS в работе применялся метод гидратации/регидратации тонкой пленки. Суть метода состоит в упаривании раствора фосфолипидов на дне круглодонной колбы для получения тонкой пленки (см. схему на рис. 1). Бислой формируется, как правило, из различных по своему происхождению фосфолипидов. Для придания жесткости бислою возможно использование холестерина [22]. Его наличие позволяет сохранить структуру липосом и повысить прочность липидного бислоя. Также важным этапом в синтезе является включение в состав антиоксидантов, используемых для предотвращения нежелательного окисления липидов. Антиоксиданты делятся на два типа в зависимости от механизма действия: превентивные (снижают скорость инициации цепной реакции) или гасящие (препятствуют развитию цепной реакции) [23]. В работе использовался

прерывающий цепь антиоксидант витамин Е. Его главная функция — дезактивация свободных радикалов и предотвращение образования или распада гидропероксидов жирных кислот [24]. Далее полученную пленку сушили и гидратировали, а затем проводили инкапсуляцию лекарственных веществ приготовленным раствором. Главным преимуществом данного метода является простота освоения, однако он имеет некоторые недостатки: полученные таким образом липосомы характеризуются низкой эффективностью инкапсуляции гидрофильных веществ [25], а также в процессе синтеза формируются многослойные липосомы, неоднородные по форме и размеру и с высокой полидисперсностью [26, 27].

Для создания однослойных везикул с высокой монодисперсностью после инкапсуляции вещества прибегали к ультразвуковой обработке. Для этих целей в работе использовался диспергатор. Суть заключалась в обработке полученной дисперсии звуковыми волнами высокой частоты, в результате чего возможно получение однослойных и гомогенных липосом. Главным недостатком такой процедуры является нагрев раствора во время обработки, в результате чего возможны окисление и гидролиз липидов, составляющих липосомальную оболочку [28]. Однако данный недостаток легко компенсировался выдержкой на охлаждающей бане.

Результаты исследования на световом микроскопе суспензии «больших» QLPS (рис. 2а), полученных гидратацией тонкой пленки, показали, что образуются ЛПС сферической формы различных размеров, требующих уточнения другими методами.

Липосомы представляют собой везикулы, наполненные раствором действующего вещества при атмосферном давлении. Поэтому при введении об-

разца в вакуумированную колонну электронного микроскопа происходит разрушение QLPS, высыхание и кристаллизация действующего вещества в состоянии нанокристаллов (рис. 2б). Поэтому для получения фотографий липосом методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в качестве протектора на стадии синтеза 2 (гидратация) вводился 2 % раствор глюкозы. Этот способ позволил получить отчетливые снимки QLPS (рис. 2в). Как видно из ПЭМ-фотографии, везикулы имеют шарообразную форму и размер от 200 до 300 нм, что совпадает с данными DLS. Внутренность везикулы скорее похожа на твердый кристалл квинакрин. По-видимому, это связано с пробоподготовкой, в ходе которой нанесенный на сетку образец высушивался. Жизнеспособность QLPS в колонне электронного микроскопа составляла несколько секунд, затем под действием перегрева электронным пучком происходил их распад на листы фосфолипидов и более мелкие кристаллы квинакрин (рис. 2г).

Распределение QLPS по размерам с концентрацией ФЛП 20 мг/мл, полученное методом DLS, до и после ультразвуковой обработки представлено на рисунке 3б. Распределение до ультразвуковой обработки имеет два максимума (табл. 1), соответствующих 93,0 и 1039,0 нм, и относительно высокий индекс полидисперсности (ИПД), равный 0,77. Максимум дзета-потенциала таких ЛПС составил -80,1 мВ (рис. 3а.1), что говорит о хорошей коллоидной устойчивости суспензии. В результате ультразвуковой обработки происходит переформирование QLPS и образуются предположительно однослойные ЛПС, объемное распределение которых по размерам имеет один максимум со значением 242,3 нм. Дзета-потенциал в результате такой обработки существенно уменьшился до значения



Рис. 1. Схема синтеза липосом с инкапсулированным квинакрином

Figure 1. Scheme of liposome synthesis with encapsulated quinacrine

-45,5 мВ. Однако такой дзета-потенциал также гарантирует устойчивость водного коллоидного раствора. После диализа и замены растворителя с водно-спиртового на физиологический раствор объемное распределение QLPS по размерам также имело один максимум со средним размером 279,8 нм. То есть проведение диализа и замена растворителя существенным образом не влияют на распределение QLPS по размерам. Индекс полидисперсности также не изменился.

В образце, в котором в качестве дисперсной среды использовался физиологический раствор, определить дзета-потенциал не удалось ввиду сжатия двойного электрического слоя из-за свойств полярного электролита.

Для исследования устойчивости коллоидной системы суспензии QLPS во времени проводились измерения размеров ЛПС через 1 и 2 недели после синтеза (рис. 3б, 4 и 5). Размер ЛПС, содержащих квинакрин, практически не изменился с течением времени, что говорит о хорошей коллоидной устойчивости полученных образцов во времени (табл. 1)

В процессе синтеза исследовалась возможность получения ЛПС с пониженным содержанием ФЛП в оболочке для возможного получения сразу однослойных ЛПС. Для этого количество ФЛП в реакционной массе было уменьшено с 20 до 5 мг/мл. Предположение оказалось верным, и преимущественный размер ЛПС составил около

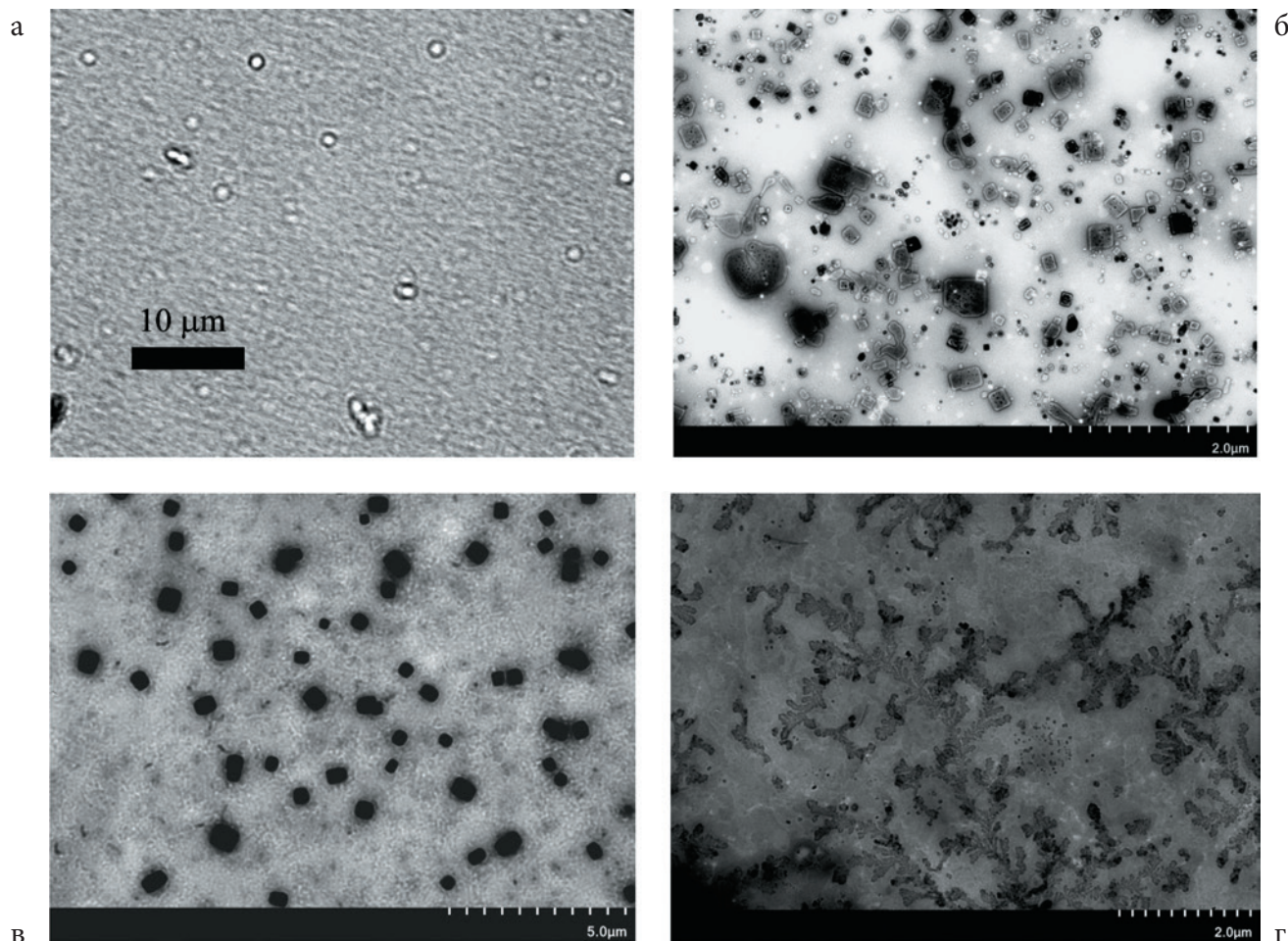


Рис. 2. Результаты исследования на световом микроскопе:

а — микроскопическое изображение «больших» ЛПС; б — ПЭМ-изображение кристаллов квинакрина, при разрушении QLPS в электронном микроскопе; в — QLPS с криопротектором; г — разрушение QLPS с криопротектором перегревом электронным пучком

Figure 2. The results of the study using a light microscope:

а — microscopic image of “large” LPS, б — TEM image of quinacrine crystals when QLPS is destroyed in an electron microscope, в — QLPS with a cryoprotector, д — destruction of QLPS with a cryoprotector by overheating of an electron beam

Таблица 1. Характеристики QLPS с концентрацией ФЛП 20 мг/мл

Table 1. Characteristics of QLPS with a FLP concentration of 20 mg/ml

№	Наименование	Гидродинамический диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	PDI
1	QLPS до УЗГ	93/1039,0 ± 5	-80 ± 4	0,77 ± 0,02
2	QLPS после УЗГ	242 ± 13	-45 ± 2	0,34 ± 0,08
4	QLPS после диализа	279 ± 9	—	0,3 ± 0,1
5	QLPS спустя 1 неделю	233 ± 15	—	0,24 ± 0,03
6	QLPS спустя 2 недели	270 ± 11	—	0,34 ± 0,03

Таблица 2. Характеристики QLPS с концентрацией ФЛП 5 мг/мл

Table 2. Characteristics of QLPS with a FLP concentration of 5 mg/ml

№	Наименование	Гидродинамический диаметр, нм	Дзета-потенциал, мВ	PDI
1	QLPS до УЗГ	300,0 ± 20	-25 ± 2	0,27 ± 0,04
2	QLPS без ХС до УЗГ	1209 ± 42	—	0,45 ± 0,05
4	QLPS без ХС после УЗГ	51/361 ± 14	—	0,27 ± 0,06

300 нм (рис. 3в.1) с достаточно низким индексом полидисперсности равным 0,27 (табл. 2). Следовательно, оказалось возможным при такой упрощенной схеме синтеза сразу получить преимущественно однослойные ЛПС, содержащие квинакрин. Удалось определить дзета-потенциал полученных таким образом QLPS, который составил -25,9. Это значение является пограничным для коллоидной устойчивости водных растворов.

Исследовалась возможность получения однослойных QLPS по отработанной схеме с содержанием ФЛП 5 мг/мл без добавления ХС. У полученных образцов наблюдается широкое объемное распределение по размерам с преобладающим размером ЛПС в микронной области (рис. 2г.2). Средний диаметр ЛПС составил 1209 нм. Индекс полидисперсности имел относительно высокое значение — 0,45 (табл. 2). Очевидно, что такой образец нуждался в ультразвуковой (УЗГ) обработке. После УЗГ обработки по принятой схеме диаметр ЛПС уменьшился до наноразмеров и имел два максимума распределения 51,0 и 361,3 нм, а индекс полидисперсности составил 0,27. Такие ЛПС также возможно использовать на практике.

Распределение по размерам QLPS, полученных использованием пониженной концентрации ФЛП,

не менялось во времени, так же, как и для липосомального квинакрин с содержанием ФЛП 20 мг/мл.

Кинетика высвобождения действующего вещества — квинакрин проводилась для образцов QLPS с содержанием ФЛП в исходной реакционной смеси 5 мг/мл и 20 мг/мл с добавлением ХС и без. Кривые высвобождения для образцов показаны на рисунке 4.

Для образца QLPS с содержанием ФЛП 5 мг/мл заметное высвобождение действующего вещества заканчивается к 210 часам с начала эксперимента (рис. 4а). ХС незначительно укрепляет липидную мембрану ЛПС и незначительно влияет на ее проницаемость для данного вида ЛПС.

Для образца QLPS с содержанием ФЛП 20 мг/мл заметное высвобождение действующего вещества заканчивается к более позднему времени: около 300 часов с начала эксперимента (рис. 4б). Это свидетельствует о более затрудненном выходе лекарственного вещества из более плотной липидной оболочки. Также этот факт подтверждается при сравнении степени поглощения, пропорциональной концентрации квинакрин, двух разных образцов — с содержанием ФЛП 5 мг/мл и 20 мг/мл. В последнем образце максимальная достигаемая концентрация квинакрин в два раза меньше. Наличие ХС в образцах

с содержанием ФЛП 20 мг/мл существенно влияет на плотность и проницаемость липидной мембраны и сильнее затрудняет выход действующего вещества (рис. 4б). Варьируя рассмотренные факторы, можно легко моделировать скорость и степень высвобождения квинакрина из QLPS, применяя эти закономерности при разработке реальных лекарственных препаратов.

При сравнении физико-химических характеристик QLPS с концентрацией ФЛП 5 мг/мл и 20 мг/мл невозможно сделать вывод о наибо-

лее выгодной концентрации. Содержание ФЛВ 20 мг/мл дает большее количество липидных слоев и, как следствие, больший гидродинамический диаметр, а полидисперсность возрастает. При этом возрастает и прочность липосом, что влияет на вероятность их разрушения в кровотоке при использовании для доставки лекарств. QLPS с концентрацией ФЛП 5 мг/мл имеют низкую полидисперсность. При этом прочность их заметно ниже, что можно компенсировать путем введения в состав ХС.

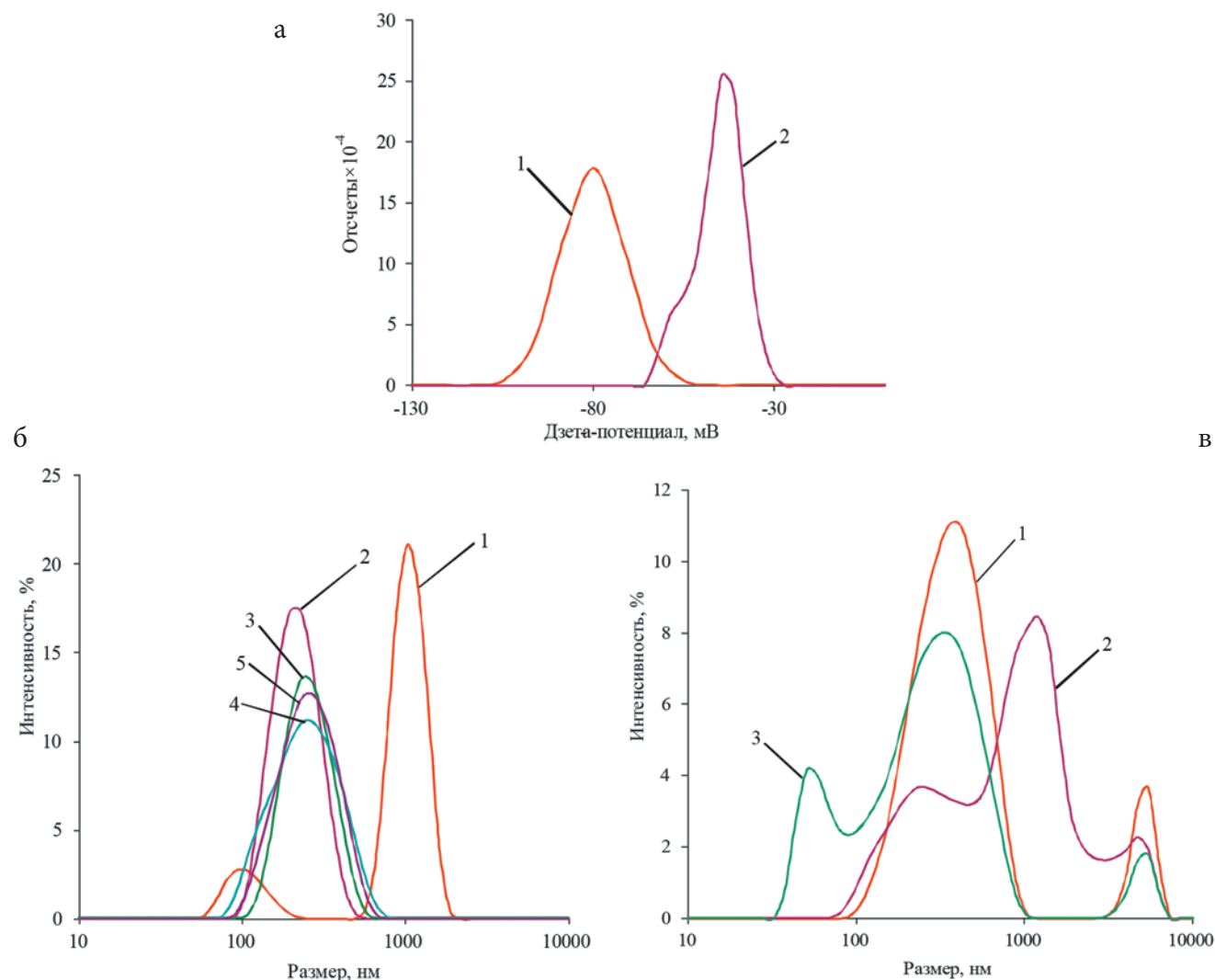


Рис. 3. Физико-химические свойства QLPS:

а — дзета-потенциал QLPS с концентрацией ФЛП 20 мг/мл, 1 — до УЗГ, 2 — после УЗГ; б — объемное распределение QLPS по размерам с концентрацией ФЛП 20 мг/мл, 1 — до УЗГ, 2 — после УЗГ, 3 — после диализа, 4 — спустя неделю, 5 — спустя 2 недели; в — объемное распределение QLPS по размерам с концентрацией ФЛП 5 мг/мл, 1 — до УЗГ с ХС, 2 — до УЗГ без ХС, 3 — после УЗГ без ХС

Figure 3. Physico-chemical properties of QLPS:

а — zeta potential of QLPS with a FLP concentration of 20 mg/ml, 1 — before ultrasound, 2 — after ultrasound; б — volumetric distribution of QLPS in size with a FLP concentration of 20 mg/ml, 1 — before ULTRASOUND, 2 — after ultrasound, 3 — after dialysis, 4 — after a week, 5 — after 2 weeks; в — volumetric distribution of QLPS by size with a concentration of FLP 5 mg/ml, 1 — up to HCG with HC, 2 — up to HCG without HC, 3 — after grog without HS

Профиль высвобождения для QLPS с содержанием ФЛП 5 мг/мл и 20 мг/мл различен. Из QLPS с концентрацией ФЛП 20 мг/мл высвобождается в 2 раза меньше ДВ, чем из QLPS с концентрацией ФЛП 5 мг/мл. По-видимому, толщина оболочки значительно влияет на количество высвобождаемого ДВ. При введении в состав ХС скорость и степень высвобождения также снижаются. Возможно,

прочность оболочки, увеличенная за счет введения ХС, также влияет на процесс высвобождения ДВ. Заметное высвобождение заканчивается примерно к 100 часам при содержании ФЛП 5 мг/мл и к 200 часам — при содержании ФЛП 20 мг/мл.

Для прослеживания пути распространения QLPS в кровотоке животного в гидратирующий раствор дополнительно добавляли флуоресцент-

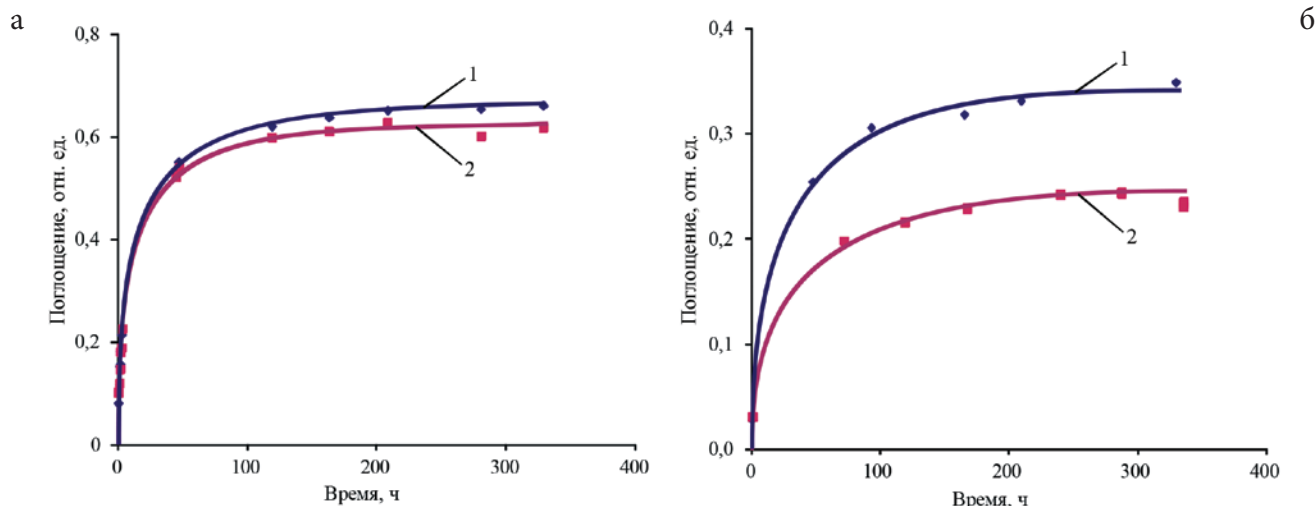


Рис. 4. Кривые высвобождения квинакрина из QLPS:

а — содержание ФЛП 5 мг/мл; б — содержание ФЛП 20 мг/мл; 1 — без ХС; 2 — с добавлением ХС

Figure 4. Quinacrine release curves from QLPS:

а — FLP content of 5 mg/ml; б — FLP content of 20 mg/ml; 1 — without HC; 2 — with HC addition

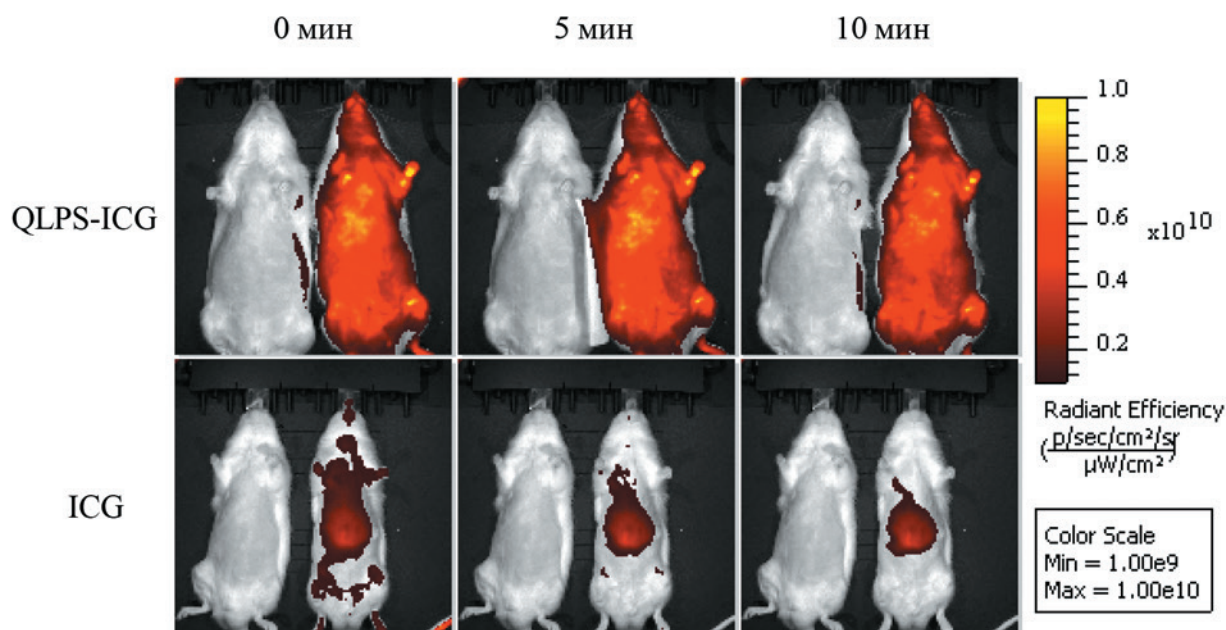


Рис. 5. Исследование распределения во времени QLPS, меченных флуоресцентным красителем ICG

Figure 5. Investigation of the time distribution of QLPS labeled with ICG fluorescent dye

ный краситель индоцианин зеленый. Это обусловлено тем, что собственная флуоресценция квинакрина находится в зеленой области спектра, где наблюдается значительная аутофлуоресценция живых тканей и шерсти животного, что крайне затрудняет регистрацию полезного сигнала. Флуоресценция ИЦЗ лежит в ближней ИК области спектра, которая является прозрачной для живых тканей (так называемое окно прозрачности).

При введении в системный кровоток наночастиц QLPS-ИЦЗ они быстро распространяются по всему организму (рис. 5). При этом ни на 5-й, ни на 10-й минуте после введения наночастицы не метаболизируются в печени, а продолжают циркуляцию в кровотоке. Это указывает на два факта. Во-первых, QLPS не разрушаются в системном кровотоке в течение, по крайней мере, 10 минут после внутривенного введения. Во-вторых, QLPS не распознаются в организме как чужеродные, подлежащие удалению, например, макрофагами. При внутривенном введении чистого флуоресцентного красителя ИЦЗ он быстро удаляется из кровотока и поступает в печень (рис. 5). Поэтому наблюдать флуоресцентную картину можно не более 10 секунд. При инкапсуляции его в липосомы можно также говорить об эффекте пролонгации. По-видимому, этот же эффект можно отнести и к квинакрину, заключенному в липосомы.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00056). / The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00056).

Данные о прохождении этического комитета

Исследования на лабораторных животных проводились с разрешения локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (протокол 21-05ПЗ#V2 от 23.03.2021).

Список литературы / References

1. Kumar A, Chen F, Mozhi A, et al. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. *Nanoscale*. 2013;5:8307–8325. DOI:10.1039/c3nr01525d.
2. Allen TM, Cullis PR. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*. 2004;303(5665):1818–1822. DOI:10.1126/science.1095833.

3. Allen TM. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994;15(7):215–220. DOI:10.1016/0165-6147(94)90314-x.
4. Allen TM, Martin FJ. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin. Onc.* 2004;31(13):5–15. DOI:10.1053/j.seminoncol.2004.08.001.
5. Balzus B, Sahle FF, Hönzke S, et al. Formulation and *ex vivo* evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *European J. Pharm. Biopharm.* 2017;115:122–130. DOI:10.1016/j.ejpb.2017.02.001.
6. Rose PG. Pegylated Liposomal Doxorubicin: Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer. *Oncologist*. 2005;10(3):205–214. DOI:10.1634/theoncologist.10-3-205.
7. Thigpen JT, Aghajanian CA, Alberts DS, et al. Role of pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;96(1):10–18. DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.09.046.
8. Katsogiannis I, Fikioris N, Kontogiorgis C, et al. Evaluation of liposomal B12 supplementation in a case series study. *Glob Drugs Therap.* 2018;3:1–4. DOI:10.15761/GDT.1000160.
9. Davis JL, Paris HL, Beals JW, et al. Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect against Ischemia-Reperfusion Injury. *Nutr Metab Insights*. 2016;9:25–30. DOI:10.4137/NMI.S39764.
10. Brilli E, Khadge S, Fabiano A, et al. Magnesium bioavailability after administration of sucrosomial® magnesium: results of an *ex-vivo* study and a comparative, double-blinded, cross-over study in healthy subjects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(6):1843–1851. DOI:10.26355/eurev_201803_14605.
11. Tsujioka T, Sasaki D, Takeda A, et al. Resveratrol-Encapsulated Mitochondria-Targeting Liposome Enhances Mitochondrial Respiratory in Myocardial Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1):112. DOI:10.3390/ijms23010112.
12. Agrawal YO, Husain M, Patil KD, et al. Verapamil hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, and assessment of cardioprotective effect in experimental model of myocardial infarcted rats. *Biomed Pharmacother.* 2022;154:113429. DOI:10.1016/j.biopha.2022.113429.
13. Taggart JV, Earle DP, Berliner RW, et al. Studies on the chemotherapy of the human malarial. V. The antimalarial activity of quinacrine. *J Clin Invest.* 1948;27(3 Pt 2):93–97. DOI:10.1172/JCI101979.
14. Otani H, Engelman RM, Breyer RH, et al. Mepacrine, a phospholipase inhibitor. A potential tool for modifying myocardial reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;92(2):247–254. PubMed PMID: 3736082.
15. van Bilsen M, van der Vusse GJ, Willemsen PH, et al. Effects of nicotinic acid and mepacrine on fatty acid

- accumulation and myocardial damage during ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(2):155–163. DOI:10.1016/0022-2828(90)91112-k.
16. Pineda B, Pérez de la Cruz V, Hernández Pando R, et al. Quinacrine as a potential treatment for COVID-19 virus infection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021;25(1):556–566. DOI:10.26355/eurrev_202101_24428.
17. Pineda B. Quinacrine, an Old Drug with Potentially usefull in the Treatment for COVID-19. *Arch Med Res.* 2021;52(8):858–859. DOI:10.1016/j.arcmed.2021.06.002.
18. Eberle RJ, Olivier DS, Amaral MS, et al. The Repurposed Drugs Suramin and Quinacrine Cooperatively Inhibit SARS-CoV-2 3CL^{pro} *In Vitro*. *Viruses.* 2021;13(5):873. DOI:10.3390/v13050873.
19. Salas Rojas M, Silva Garcia R, Bini E, et al. Quinacrine, an Antimalarial Drug with Strong Activity Inhibiting SARS-CoV-2 Viral Replication *In Vitro*. *Viruses.* 2021;13(1):121. DOI:10.3390/v13010121.
20. Puhl AC, Fritch EJ, Lane TR, et al. Repurposing the Ebola and Marburg Virus Inhibitors Tilorone, Quinacrine, and Pyronaridine: *In Vitro* Activity against SARS-CoV-2 and Potential Mechanisms. *ACS Omega.* 2021;6(11):7454–7468. DOI:10.1021/acsomega.0c05996.
21. Sonin DL, Pochkaeva EI, Papayan GV, et al. Cardio- and vasoprotective effect of quinacrine on a model of ischemic-reperfusion injury of the myocardium in rats *in vivo*. *Byulleten' e'ksperimental'noj biologii i mediciny*=Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2024;2(177):152–159. In Russian [Сонин Д.Л., Почкаева Е.И., Папаян Г.В. и др. Кардио- и вазопротекторный эффект квинакрина на модели ишемически-реперфузионного повреждения миокарда у крыс *in vivo*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024;2(177):152–159].
22. Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(1):381–391. DOI:10.3109/21691401.2014.953633.
23. Nsairat H, Khater D, Sayed U, et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon.* 2022;8(5):e09394. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
24. Niki E. Lipid oxidation that is, and is not, inhibited by vitamin E: Consideration about physiological functions of vitamin E. *Free Radic Biol Med.* 2021;176:1–15. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.001.
25. Amstad E, Kohlbrecher J, Müller E, et al. Triggered Release from Liposomes through Magnetic Actuation of Iron Oxide Nanoparticle Containing Membranes. *Nano Lett.* 2011;11(4):1664–1670. DOI:10.1021/nl2001499.
26. Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, et al. Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *International Journal of Food Properties.* 2008;11(4):833–844. DOI:10.1080/10942910701648115
27. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology.* 2012;1(2):147–168. DOI:10.1166/jcsb.2012.1020.
28. Monnier CA, Burnand D, Rothen-Rutishauser B, et al. Magnetoliposomes: opportunities and challenges. *European Journal of Nanomedicine.* 2014;6(4):201–215. DOI:10.1515/ejnm-2014-0042.
29. Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on *in vitro* drug release. *Drug Deliv Transl Res.* 2015;5(3):231–242. DOI:10.1007/s13346-015-0220-8.
30. Demel RA, De Kruffy B. The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1976;457(2):109–132. DOI:10.1016/0304-4157(76)90008-3.

Информация об авторах:

Никифоров Алексей Игоревич, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Истомина Мария Сергеевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Королев Дмитрий Владимирович, д.х.н., заведующий НИЛ нанотехнологий ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России;

Мурин Игорь Васильевич, д.х.н., заведующий кафедрой химии твердого тела Института химии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет».

Authors information:

Alexey I. Nikiforov, Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Galina A. Shulmeyster, Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Maria S. Istomina, Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry V. Korolev, PhD, Head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; Researcher of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Igor V. Murin, PhD, Head of the Solid State Chemistry Department of Institute of chemistry, Saint Petersburg State University.