

# СТВОРЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОСОМНОЇ ФОРМИ АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТУ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

О. В. Хробатенко<sup>1</sup>  
Н. В. Приткульська<sup>1</sup>  
С. М. Шульга<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний торговельно-економічний університет,  
Україна  
<sup>2</sup>ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
НАН України», Київ

E-mail: shulga5@i.ua

Отримано 27.02.2013

Досліджено використання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату для перорального введення. Наведено методи одержання і визначення розмірів ліпосом та відсоткового вмісту в них аденозин-5-трифосфату. Вивчено вплив ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату на фізичну працездатність лабораторних тварин методом плавання до граничного виснаження. Показано, що застосування ліпосомної форми порівняно з вільним аденозин-5-трифосфатом (за аналогічного дозування) сприяло підвищенню працездатності лабораторних тварин. За одноразового введення ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг підвищилась працездатність на 62%, а в дозі 60 мг/кг – на 76%, 12 днів – на 64% і 93%, відповідно.

**Ключові слова:** аденозин-5-трифосфат, ліпосоми, ліпосомна форма аденозин-5-трифосфату, фізична працездатність.

Аденозин-5-трифосфат (АТФ) — нуклеотид, який відіграє роль універсального джерела енергії для біохімічних процесів, що відбуваються в організмі людини [1]. За активації м'язової діяльності гідроліз АТФ пришвидшується й інтенсивність енергетичного обміну зростає в 100–1 000 разів порівняно зі станом спокою. Проте запасів АТФ вистачає лише на перші 2–3 с рухової активності, після чого організмові доводиться їх поновлювати [2].

Концентрація АТФ у м'язах відображає баланс між швидкістю ресинтезу АТФ та швидкістю його утилізації. Величина концентрації, навіть під час довільного скорочення м'язів, завжди є досить стабільною. З підвищенням активності скорочення м'язів підвищується ступінь утилізації АТФ, що пов'язано зі значним збільшенням активності ензимів, які беруть у цьому участь. Із фізіологічного погляду зниження швидкості використання АТФ призводить до розвитку втоми або неспроможності м'язів виконувати необхідну роботу. У цій ситуації втома виконує роль захисного бар'єра, який забезпечує підтримку достатнього рівня АТФ у тому разі, коли механізми його ресинтезу не дають змоги задоволь-

нити потребу в цій сполуці. Пригнічення АТФазної активності призводить до зниження швидкості утилізації АТФ, що перешкоджає надмірному зменшенню його рівня в м'язовому волокні [3].

Додаткове споживання АТФ дає змогу поповнювати енергетичні ресурси організму, сприяє адаптації до інтенсивних фізичних навантажень, підвищенню фізичної працездатності та прискоренню процесів відновлення. Однак через дуже короткий період напіврозпаду в крові виникає проблема складності доставлення АТФ до клітин. За екзогенного надходження АТФ швидко руйнується під дією позаклітинних ензимів до аденозиндифосфату (рис. 1), а потім до аденозинмонофосфату і аденозину [2].

Окрім того, АТФ, як й інші гідрофільні аніони, не може потрапити до клітини через плазматичну мембрану. Вищезазначені фактори унеможливають використання АТФ як біоенергетичного субстрату [4–7].

У пошуках альтернативного способу захисту від руйнування за перорального застосування АТФ було досліджено ліпосомні форми АТФ. Широкі можливості застосування ліпосом (замкнених везикул, оточених одним або декількома шарами ліпідів),



Рис. 1. Реакція розпаду АТФ

зумовлені сукупністю їхніх біологічних властивостей: хімічною інертністю, біосумісністю, відсутністю токсичності [8]. Ліпосоми здатні спрямовано доставляти біологічно активні речовини у потрібні органи і тканини організму.

Ліпосоми використовують у медицині і харчовій промисловості. Також як вектори їх застосовують у генній терапії.

Ефективність ліпосомної форми АТФ було продемонстровано в низці досліджень. Зокрема, в роботі [9] показано позитивний ефект застосування ліпосомної форми АТФ для захисту ендокринних клітин людини від нестачі енергетичних ресурсів у моделі клітинної культури сепсису. У роботі [10] встановлено, що використання ліпосомної форми АТФ дає змогу компенсувати більшу кількість ішемічних виявів, допустимих перед зниженням електричної активності мозку і остаточним руйнуванням його клітин. У роботах [5, 6] показано, що ліпосомна форма АТФ захищає клітини міокарда від ішемічних і реперфузійних ушкоджень. У вищезазначених роботах ліпосомні форми АТФ вводили парентерально.

Мета роботи полягала у виборі оптимального способу отримання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування та дослідження ефективності споживання ліпосомної форми АТФ з метою підвищення фізичної працездатності.

## Матеріали і методи

**Виготовлення ліпосомної форми АТФ** здійснювали, використовуючи метод заморожування-відтавання, що є найбільш ефективним для включення АТФ у ліпосоми [4]. Для отримання ліпосом брали суміш соняшникового лецитину (ВАТ «НВЦ Дніпротехнології», Україна), холестеролу (AppliChem GmbH, Німеччина) і поліетиленгліколю (A.C.E.F. S.p.A., Італія) у масовому співвідношенні 2,45:1:0,04. Підготовлену суміш розчиняли в органічному розчиннику та випарювали в ротаційному випарювачі до утворення ліпідної плівки. Процес гідролізу ліпідної плівки проводили за температури 40 °C розчином АТФ (Sigma, США) за кон-

центрації 20 ммоль/л протягом 30 хв. Здійснювали 10 циклів заморожування-відтавання. Заморожування проводили за температури -80 °C, танення — на водяній бані за +30 °C [11]. Розчин АТФ, що не ввійшов у ліпосоми, відділяли центрифугуванням [4]. Одержаний розчин пропускали через екструдер із мембранами, діаметром пор 200 і 100 нм.

**Вміст включеного в ліпосоми АТФ** визначали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (Dionex Ultimate 3000, колонка Discovery C18 250×4,6 мм, 5 мкм, Supelco (США), аналіз проводили в ізократичних умовах, рухома фаза — суміш 0,1 моль буфера  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  і метанолу у співвідношенні 96:4 v/v за швидкості потоку 1 мл/хв,  $\lambda = 254$  нм [4–7]).

**Розмір ліпосом обчислювали** за допомогою динамічного світлорозсіювання, використовуючи лазерний фотонкореляційний спектрометр Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Великобританія) [12]. Спектрометр дає змогу встановити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині, аналізуючи характерний час флуктуації інтенсивності розсіяного світла. Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від водної суспензії ліпосомної форми АТФ, здійснювали за температури 25 °C під кутом розсіювання 173°. Для контролю стабільності вимірювання повторювали 4 рази. Результати розподілу за розмірами в одиницях інтенсивності та кількісному вимірі одержали з аналізу кореляційної функції з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення Zetasizer Software 6.20.

**Для визначення біодоступності ліпосомної форми АТФ** було використано 50 білих лінійних мишей-самців з масою тіла 22–28 г. Дослідні тварини перебували у віварії за температури повітря 20–24 °C, вологості — не більше 65%, у режимі «день-ніч». Тварини знаходились у металевих клітках достатнього розміру, на стандартному раціоні віварію і отримували питну воду та корм *ad libitum* [13]. Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–IV Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2011 рр.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей», Страсбург, 1985 [14]. Протокол дослідів було погоджено Комісією

з біоетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Методом випадкової вибірки тварини було розподілено на 5 груп по 10 особин:

- перша — інтактна група тварин, яких утримували за стандартних умов віварію (контроль);
- друга — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- третя — група тварин, яким перорально вводили АТФ з розрахунку 60 мг/кг;
- четверта — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 30 мг/кг;
- п'ята — група тварин, яким перорально вводили ліпосомну форму АТФ з розрахунку 60 мг/кг.

Результати досліджень зі встановлення активності АТФ [15, 16] було враховано під час вибору доз. Ліпосомну форму АТФ і АТФ у вільному вигляді вводили за 5 хв до початку експерименту.

Вплив ліпосомної форми АТФ на фізичну працездатність лабораторних тварин вивчали за методом плавання до граничного виснаження [17].

Експериментальних тварин поміщали в резервуар діаметром 1,5 м, завглибшки 0,8 м, заповнений водою з температурою 28–32 °С. З води попередньо видаляли бульбашки повітря шляхом кип'ятіння. Вантаж, що становив 7,5% від маси тіла тварини, прикріплювали до основи її хвоста таким чином, щоб тварина могла вільно рухатись. Критерієм стомлювання і припинення плавання вважали перше «пірнання» із зануренням носових пазух у воду. Ефективність дії ліпосомної форми АТФ оцінювали за збільшенням тривалості плавання дослідних груп порівняно з контрольними групами, які отримували АТФ у вільному вигляді [17]. Експеримент проводили на 6-ту та 12-ту

добу за щоденного споживання мишами ліпосомної форми АТФ. В інші дні миші виконували тренувальне плавання в резервуарі без вантажу протягом 15 хв.

**Статистичну обробку результатів** проводили шляхом розрахунку середніх арифметичних величин, їх середньоквадратичних відхилень і похибок. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Ст'юдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними за  $P \leq 0,05$  [18].

### Результати та обговорення

Ефективність включення АТФ у ліпосоми визначали методом вискоефективної рідинної хроматографії.

Після статистичної обробки отриманих даних кількість АТФ, включеного в ліпосоми, з вірогідністю  $P = 0,95$  становила  $41,7 \pm 0,9\%$ . Одержані результати свідчать про відносно високий рівень включення АТФ, що співвідноситься з даними літератури [4].

Вимірювання кореляційної функції флуктуацій інтенсивності розсіяного світла й інтегральної інтенсивності розсіювання дає змогу визначити коефіцієнт трансляційної дифузії дисперсних частинок в розчинах і за рівнянням Стокса встановити розподіл наночастинок за розміром. Вимірювання повторювали 4 рази з усередненням результату (рис. 2, а). Діапазон дисперсності ліпосом в одиницях інтегральної інтенсивності розсіювання виявився досить широким (рис. 2, б). За результатами проведених досліджень було встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною.

Розміри сумарної фракції ліпосом знаходились у межах від 30 до 1 000 нм, хоча розміри переважної більшості ліпосом ( $W$  за кількістю = 91%) — в діапазоні від 30 до

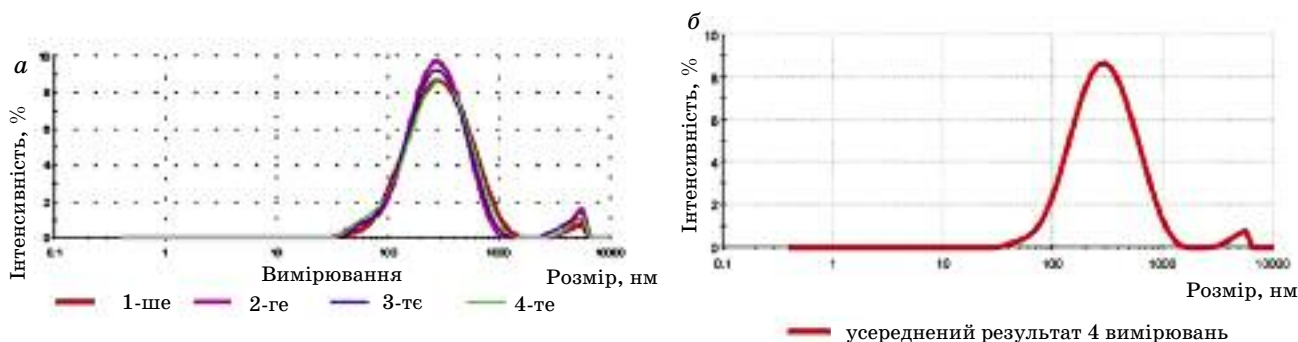


Рис. 2. Розподіл сумарної фракції ліпосомної форми АТФ за розмірами (в одиницях інтенсивності)

100 нм (рис. 3, а, б) і лише незначна кількість фосфоліпідних структур ( $W$  за кількістю = 9%) мали розміри, що перевищують 100 нм.

Між рисунками 2 і 3 існує принципова різниця. Перший дає уявлення про інтегральний (сумарний) розподіл всіх частинок (везикул) у розчині. Другий показує конкретне розподілення частинок з вірогідністю  $P \leq 95\%$  за розмірами (30–100 нм).

Проте розміри останніх настільки великі, що їхня інтегральна інтенсивність розсіювання ( $W$  за інтенсивністю = 93%) значно перевищує цей показник для всіх ліпосом, менших за 100 нм ( $W$  за інтенсивністю = 7%).

Одержані дані можуть свідчити про наявність у досліджуваному зразку мультиламелярних ліпосом (складаються з багатьох ліпідних шарів, розділених водними фазами, і мають великі розміри) [8].

Результати дослідження функціональної ефективності ліпосомної форми АТФ наведено в таблиці.

Проведені дослідження згідно з методом плавання до граничного виснаження показали, що інтактна група тварин на 6-й день експерименту утримувалась на воді протягом  $138,4 \pm 5,5$  с, що співвідноситься з даними літератури [17].

Як впливає з даних таблиці, тривалість утримання на воді 2-ї та 3-ї груп дослідних тварин як на 6-й, так і на 12-й день експерименту достовірно не відрізнялись ( $P \leq 0,05$ )

від інтактної групи (контроль) в аналогічний період дослідження. Це підтверджує той факт, що у вільному вигляді АТФ не може слугувати біоенергетичним субстратом [4–7].

Для 4-ї та 5-ї груп тривалість утримання тварин на воді на 6-й день експерименту становила  $234,8 \pm 5,1$  с ( $P \leq 0,05$ ) і  $237,6 \pm 4,7$  с ( $P \leq 0,05$ ), що на 70% і 91% вище, відповідно, ніж результати інтактної групи. На 12-й день експерименту тривалість утримання тварин на воді 4-ї та 5-ї груп на 71% ( $P \leq 0,05$ ) і 106% ( $P \leq 0,05$ ), відповідно, перевищувала результати інтактної групи (контролю).

Таким чином, введення ліпосомної форми АТФ сприяло підвищенню фізичної працездатності лабораторних тварин за одноразового споживання протягом 6 днів у дозі 30 мг/кг на 62% ( $P \leq 0,05$ ), у дозі 60 мг/кг — на 76% ( $P \leq 0,05$ ), а протягом 12 днів — на 64% ( $P \leq 0,05$ ) і 93% ( $P \leq 0,05$ ), відповідно, порівняно із застосуванням АТФ у вільному вигляді за аналогічного дозування.

Одержані дані свідчать про властивість ліпосомної форми АТФ затримувати настання втоми. Введення АТФ у вільному вигляді суттєвим чином не вплинуло на фізичну витривалість лабораторних тварин, що може свідчити про швидку деградацію цієї речовини в організмі.

Слід зауважити, що енергетичний стан м'язової тканини є далеко не єдиним чинником,

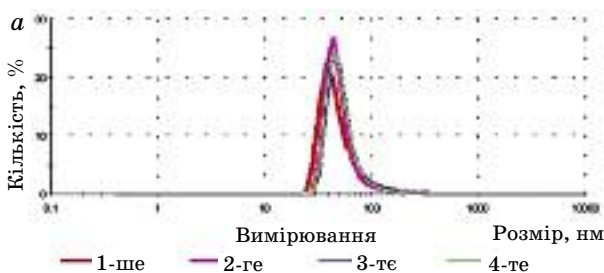


Рис. 3. Кількісний розподіл ліпосомної форми АТФ за розмірами

#### Дослідження ефективності ліпосомної форми АТФ

День експерименту	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група
	Тривалість плавання, с				
6-й	$138,4 \pm 5,5$	$144,5 \pm 2,7$	$149,9 \pm 4,6$	$234,8 \pm 5,1^*$	$264,3 \pm 7,1^*$
12-й	$138,9 \pm 6,5$	$145,2 \pm 3,9$	$148,3 \pm 5,1$	$237,6 \pm 4,7^*$	$286,3 \pm 9,4^*$

Примітка: \*  $P \leq 0,05$  порівняно з контролем (перша група).

на який впливає АТФ для запобігання розвиткові втоми [3]. У роботі [15] було зроблено припущення про вплив АТФ на пуриноенергетичні рецептори з наступним метаболічним ефектом. Екзогенні макроергічні нуклеотиди не можуть слугувати субстратом енергетичних шляхів як через незначну їх кількість, так і через швидку метаболічну деградацію. Результати досліджень [15] дають підстави вважати, що такий ефект може бути основним у механізмі актопротекторного впливу нуклеотидів. Відомо, що пуринові нуклеотиди беруть участь у регуляції активності аденілатциклазної системи. Варто зазначити, що ефекти, які спричинюють пуринові нуклеотиди, мають різноспрямований характер, який залежить від специфічності тканини. Крім того, екзогенний АТФ виявляє виражені ангіодилатуючі властивості і, таким чином, може змінювати співвідношення притоку і відтоку метаболітів у функціонально активних органах у бік їх оптимізації.

Таким чином, у результаті проведених досліджень було використано оптимальний спосіб одержання ліпосомної форми АТФ для перорального застосування, що забезпечив відносно високий рівень включення АТФ у ці частинки. Встановлено, що ліпосомна форма АТФ є стабільною і в разі використання екструдерів з мембранами відповідних розмірів (200 нм і 100 нм) можна отримати ліпосоми, розміри яких лежать у діапазоні 30–100 нм. Метод плавання до граничного виснаження показав, що використання ліпосомної форми АТФ сприяло збільшенню фізичної витривалості лабораторних тварин порівняно з інтактною групою та групами, яким уводили вільний АТФ.

Одержані дані можуть свідчити про затримку настання втоми пуриновими нуклеотидами. Це підтверджує той факт, що ліпосомна форма АТФ може слугувати біоенергетичним субстратом і застосовуватись для створення харчових продуктів для дієтичного споживання.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Gordon J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate // *Biochem. J.* — 1986. — P. 309–319.
2. Спрайет Л. Анаэробный метаболизм при высокоинтенсивных физических нагрузках // *Метаболизм в процессе физической деятельности* / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 9–51.
3. Грин Г. Метаболические факторы утомления // *Метаболизм в процессе физической деятельности* / Под ред. М. Харгривса. — К.: Олимп. лит. — 1998. — С. 233–286.
4. Liang W., Levchenko T. S., Torchilin V. P. Encapsulation of ATP into liposomes by different methods: optimization of the procedure // *J. Microencapsul.* — 2004. — P. 251–261.
5. Hartner W. C., Verma D. D., Levchenko T. S. et al. ATP-loaded liposomes for treatment of myocardial ischemia. *WIREs. Nanobiotechnol.* — 2009. — P. 530–539.
6. Verma D. D., Levchenko T. S., Bernstein E. A., Torchilin V. P. ATP-loaded Liposomes Effectively Protect Mechanical Functions of the Myocardium from Global Ischemia in an Isolated Rat Heart Model // *J. Control. Release.* — 2005. — P. 460–471.
7. Arakawa A., Ishiguro S., Ohki K., Tamai M. Preparation of liposome-encapsulation of adenosine triphosphate // *Tohoku J. Exp. Med.* — 1998. — P. 39–47.
8. Морозова Ю. А. Липосомальная система доставки антигена вируса ССЯ-76 для пероральной иммунизации птиц: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23. СПб. гос. технолог. ин-т. — СПб., 2003. — 20 с.
9. Han Y. Y., Huang L., Jackson E. K. et al. Liposomal ATP or NAD<sup>+</sup> protects human endothelial cells from energy failure in a cell culture model of sepsis // *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* — 2001. — P. 107–116.
10. Laham A., Claperon N., Durussel J. J. et al. Intracarotid administration of liposomally-entrapped ATP: improved efficiency against experimental brain ischemia // *Pharmacol. Res. Commun.* — 1988. — P. 699–705.
11. Пат. 77865 UA, A23J 7/00, A61K 9/127, A61K 31/7076. Спосіб отримання ліпосомної форми аденозин-5-трифосфату (АТФ) для перорального застосування / Притульська Н. В., Хробатенко О. В., Шульга С. М. — Заявл. 20.09.2012; Опубл. 25.02.13; Бюл. № 4. — 4 с.
12. *The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes* [Electronic resource] — [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk).

13. *Науково-практичні* рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. — К.: Авіцена, 2002 р. — 156 с.
14. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.* — Council of Europe, Strasbourg, 1986. — 53 p.
15. Мороз В. М., Липницький Т. Н., Кутняк В. П. и др. Изучение и сравнительная оценка актопротекторной активности АТФ-ЛИОНГ в эксперименте // Лік. справа. — 2002. — № 7. — С. 99–101.
16. Вдовенко Н. В. Вплив аденозинтрифосфатвмісних сполук на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу за умов інтенсивного фізичного навантаження: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.04. Нац. аграр. ун-т. — К., 2005. — 20 с.
17. Бобков Ю. Г., Виноградов В. Н. Фармакологическая коррекция утомления. — М.: Медицина, 1984. — 206 с.
18. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 144 с.

**СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ  
ЛИПОСОМНОЙ ФОРМЫ  
АДЕНОЗИН-5-ТРИФОСФАТА  
ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

*А. В. Хробатенко<sup>1</sup>  
Н. В. Притульская<sup>1</sup>  
С. М. Шульга<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Киевский национальный  
торгово-экономический университет,  
Украина

<sup>2</sup>ГО «Институт пищевой биотехнологии  
и геномики НАН Украины», Киев

*E-mail:shulga5@i.ua*

**CREATING AND INVESTIGATION  
OF ADENOSINE-5-TRIPHOSPHATE  
LIPOSOMAL FORMS  
FOR ORAL APPLYING**

*O. V. Khrobotenko<sup>1</sup>  
N. V. Prytul'ska<sup>1</sup>  
S. M. Shulga<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Kyiv National University of Trade  
and Economics, Ukraine

<sup>2</sup>State Organization «Institute of Food  
Biotechnology and Genomics» of National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail:shulga5@i.ua*

Исследовано использование липосомной формы аденозин-5-трифосфата для перорального введения. Приведены методы получения и определения размеров липосом, а также процентного содержания в них аденозин-5-трифосфата. Изучено влияние липосомной формы аденозин-5-трифосфата на физическую работоспособность лабораторных животных методом плавания до предельного истощения. Показано, что использование липосомной формы по сравнению со свободным аденозин-5-трифосфатом (в аналогичной дозировке) способствовало увеличению работоспособности лабораторных животных. Применение липосомной формы при однократном введении в течение 6 дней в дозе 30 мг/кг способствовало увеличению работоспособности на 62%, в дозе 60 мг/кг — на 76%, 12 дней — на 64% и 93% соответственно.

**Ключевые слова:** аденозин-5-трифосфат, липосомы, липосомная форма аденозин-5-трифосфата, физическая работоспособность.

Liposomal form of adenosine-5-triphosphate (ATP) for oral applying was studied. The methods of obtaining and determining the size of the liposomes, the definition of ATP percentage content in liposomes were proposed. The effect of liposomal form of ATP on physical performance of laboratory animals by swimming to the limit of exhaustion was studied. It was shown that using of the liposomal form as compared with free ATP (in a similar dose) promoted the increased efficiency of laboratory animals. Application of liposomal form occurring at single administration for 6 days at a dose of 30 mg/kg facilitated a 62% increase of efficiency, and 60 mg/kg did 76%, while consumption of liposomal form of ATP for 12 days did 64% and 93%, respectively.

**Key words:** liposomes, liposomal form ATP, physical performance.