

# Исследование влияния липосомальной формы $\alpha$ -липоевой кислоты на систему гемостаза человека

**В. А. Щелконогов**, аспирант, м.н.с.<sup>1,2</sup>

**К. С. Саврас**, студент<sup>1</sup>

**К. Н. Жигалова**, студент<sup>1</sup>

**А. В. Чеканов**, к.б.н., с.н.с.<sup>1</sup>

**О. А. Баранова**, к.б.н., с.н.с.<sup>1</sup>

**К. Д. Казаринов**, к.б.н., вед. научный сотрудник<sup>3</sup>

**Г. М. Сорокоумова**, к.х.н., доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации<sup>2</sup>

**Н. С. Шастина**, к.х.н., доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации<sup>2</sup>

**В. П. Мудров**, к.м.н., врач клинико-диагностической лаборатории<sup>4</sup>

**Э. Ю. Соловьева**, д.м.н., проф., зав. лабораторией<sup>1</sup>

**А. И. Федин**, д.м.н., проф., заслуженный врач России, зав. кафедрой неврологии ФДПО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» (РНИМУ) Минздрава России, г. Москва

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет» Минобрнауки России, г. Москва

<sup>3</sup>Фрязинский филиал ФГБУН «Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова» РАН, г. Фрязино

<sup>4</sup>ФГБУ «9-й лечебно-диагностический центр» Минобороны России, г. Москва

## Study of liposomal form of alpha-lipoic acid effect on human hemostatic system

V. A. Shchelkonogov, K. S. Savras, K. N. Zhigalova, E. Yu. Solovyova, O. A. Baranova, A. V. Chekanov, K. D. Kazarinov, V. P. Mudrov, A. I. Fedin  
Russian National Research Medical University n. a. N. I. Pirogov, Moscow; MIREA — Russian Technological University, Moscow;  
Fryazino Branch of the Institute of Radio Engineering and Electronics n. a. V. A. Kotelnikov, Fryazino, Moscow Region; Russia

### Резюме

Проведено исследование влияния липосомальной формы  $\alpha$ -липоевой кислоты на систему свертывания крови человека. Не было выявлено достоверного влияния фосфатидилхолиновых липосом, содержащих и не содержащих  $\alpha$ -липоевую кислоту на плазменное звено гемостаза. Показано, что липосомальная форма  $\alpha$ -липоевой кислоты при концентрациях 0,2–0,4 мг/мл дозозависимо подавляет агрегацию тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы крови человека, индуцированную арахидоновой кислотой, а также препятствует снижению гранулярности тромбоцитов.

Ключевые слова: фосфолипиды, проточная цитофлуориметрия, спектрофлуориметрия, наночастицы, тромбоциты,  $\alpha$ -липоевая кислота, липосомы, наноконтейнеры.

### Summary

The study of the effect of the liposomal form of  $\alpha$ -lipoic acid on the human blood coagulation system. There was no significant effect of phosphatidylcholine liposomes containing and not containing  $\alpha$ -lipoic acid on the plasma link of haemostasis. It is shown that the liposomal form of  $\alpha$ -lipoic acid at concentrations of 0.2–0.4 mg/ml dose-dependent inhibits platelet aggregation in the platelet-rich human plasma induced by arachidonic acid, and prevents the reduction of platelet granularity.

Key words: phospholipids, flow cytometry, spectrofluorometry, nanoparticles, platelets,  $\alpha$ -lipoic acid, liposomes, nanocontainers.

Нарушение функционирования головного мозга происходит вследствие развивающегося ишемического повреждения, в результате которого прекращается доставка к нему кровью кислорода и глюкозы, что приводит к нарушению мозгового кровоснабжения и последующему повреждению мозговой ткани [1].

Происходят активизация сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза и нарушение реологических свойств крови, что может привести к опасным последствиям для организма, тромбообразованию [2–4]. Развивается воспаление, способствующее повреждению гематоэнцефалического барьера и ведущее к дальнейшему повреждению мозговой ткани. Нарастающий окислительный стресс приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), интенсивно взаимодействующих с молекулярными соединениями, формирующими нейрональные и внутриклеточные мембраны [5, 6].

Применение нейропротективных и антиоксидантных препаратов вызывает снижение развития острого повреждения нейрональной ткани и способствует восстановлению функций мозга [7, 8]. В качестве адекватной терапии на сегодняшний день применяют водорастворимую форму  $\alpha$ -липоевой кислоты. Данный лекарственный препарат используется как антиоксидант при лечении острого и хронического воспаления периферической нервной системы. Однако биодоступность этого средства невысока из-за воздействия ферментных систем организма, быстрой деградации, отсутствия возможности пройти через ГЭБ. Поэтому главным вопросом остается способ доставки лекарственного вещества. Нейропротективное действие водорастворимой формы  $\alpha$ -ЛК, связанное с предотвращением повреждающего воздействия свободных радикалов на клеточные мембраны и уменьшением выраженности

окислительного стресса, является патогенетическим обоснованием использования его как антиоксидантного средства при ишемическом поражении головного мозга [9].

На протяжении последних лет одним из популярных исследуемых транспортеров являются липосомы. Достоверное определение характеристик данных наноконструкций и их влияния на систему гемостаза человека является необходимым условием для их применения в практике.

Таким образом, целью нашей работы было исследовать влияние липосомальной формы  $\alpha$ -ЛК на систему гемостаза в условиях *in vitro*.

## Материалы и методы

**Химические реактивы.** Все соли, используемые в работе для приготовления буферных растворов были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США),  $C_{40}H_{70}N_5O_{11}P$  Avanti Polar Lipids (США), фосфатидилхолин (ФХ) Avanti Polar Lipids (США),  $\alpha$ -липовая кислота Sigma-Aldrich (США), этилендиаминовая соль  $\alpha$ -липовой кислоты Sigma-Aldrich (США), арахидоновая кислота НПО «Ренам» (Россия),  $C_2H_{50}N$  «ХимМед» (Россия).

### Получение обогащенной тромбоцитами плазмы.

Кровь забиралась у здоровых доноров ( $n = 14$ ) в полистироловые вакуумные пробирки с цитратом натрия. Стабилизированную цитратом натрия кровь центрифугировали 10 минут при 200 g для получения ОТП. Далее ОТП отбиралась в чистую пробирку. Оставшуюся плазму повторно центрифугировали в течение 25 минут при 400 g. Получали бедную тромбоцитами плазму. Также отбирали в чистую пробирку. Инкубировали при  $+37^\circ C$  не более трех часов.

**Получение липосом.** Липосомы были получены в МИРЭА — Российский технологический университет в лаборатории кафедры биотехнологии и фармация, методом экструзии из чистого неокисленного соевого ФХ (с концентрацией малонового альдегида [МДА] 0,464 нмоль/мл и индексом окисления 0,17). Для выделения был использован экструдер LiposoFast basic (Avestin Inc., США). Размер полученных липосом определяли методом турбодиметрии с использованием спектрофотометра Shimadzu UV. Спектр поглощения регистрировали в интервале 200–400 нм.

Для получения липосом с альфа-липовой кислотой готовили стоковый раствор из 50 мг альфа-липовой кислоты, растворенной в 10 мл 96-процентного этанола с конечной концентрацией ЛК = 5 мг/мл. Отбирали 1 мл в эппендорф и растворяли в нем 40 мг ФХ. Полученный раствор анализировали спектрофотометрическим методом в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Содержание препарата в липосомах определяли по поглощению ЛК на длине волны 330 нм. В результате дальнейшей работы

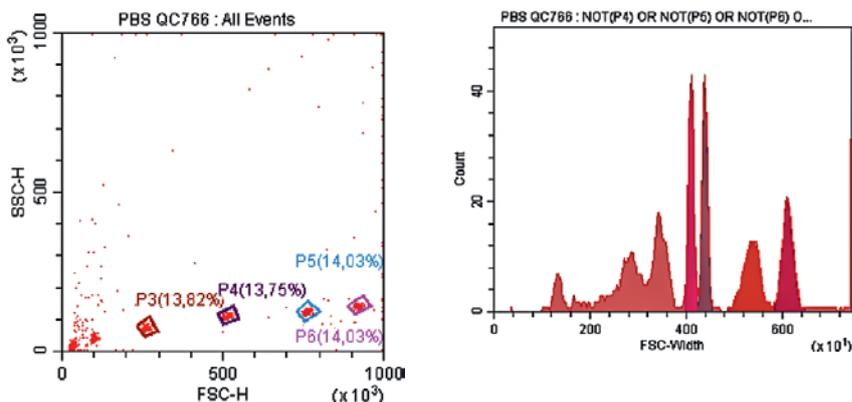


Рисунок 1. Параметры фронтального, бокового светорассеяния и размеров стандартизированных калибровочных частиц CytoFLEX Daily QC от 0,9–6,5 мкм. Измерения проводились в суспензии клеток тромбоцитов (1 млн Кл) при длине волны 488 нм. К клеткам добавляли исследуемый препарат  $\alpha$ -ЛК. Объем пробы 250 мкл.

были получены флуоресцентно-меченные фосфатидилхолиновые липосомы. Полученные меченные липосомы имеют высокую интенсивность зеленой флуоресценции ( $E_m = 530$  нм), обусловленную наличием флуоресцентной метки на конце гидрофобной части ФХ.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для измерения оптических свойств индивидуальных клеток в суспензии использовали проточный цитофлуориметр CytoFLEX (Beckman, США). При помощи данного прибора измерялись такие параметры клеток, как светорассеяние под разными углами и флуоресценция в различных диапазонах спектра. Когда клетка проходит через лазерный луч, свет рассеивается во всех направлениях. Свет, рассеянный в прямом направлении под малыми углами ( $0,5-10^\circ$ ) от оси, пропорционален квадрату радиуса сферы и, следовательно, размеру клетки или частицы. Детектор прямого светорассеяния (FSC, от англ. forward scatter) располагается по ходу лазерного луча. Центральная часть FSC-детектора экранирована, поэтому нерассеянное лазерное излучение им не регистрируется [10]. Свет может проникать в клетку, и отражаться и преломляться ядром и другим содержимым клетки. Детектор бокового светорассеяния (SSC, от англ. side scatter) располагается под углом в  $90^\circ$  относительно направления лазерного луча. Боковое светорассеяние можно считать пропорциональным гранулярности клетки [10]. Калибровку проточного цитометра осуществляли, используя стандартные калибровочные частицы CytoFLEX Daily QC Fluorospheres (Beckman Coulter, США).

**Агрегометрия.** С целью определения антиагрегационной активности  $\alpha$ -липовой кислоты производили агрегометрию тромбоцитов с использованием прибора AggRam Helena (Великобритания) при температуре  $37^\circ C$ . Проба представляла 250 мкл плазмы с добавлением различных концентраций исследуемых веществ: водорастворимая форма  $\alpha$ ЛК; ФХ-липосомы; липосомы с  $\alpha$ ЛК. В течение минуты регистрировали спонтанную агрегацию тромбоцитов, после чего добавляли индуктор активации, с конечной концентрацией 0,05 мг/мл. В качестве активатора использовали водный раствор арахидоновой кислоты.

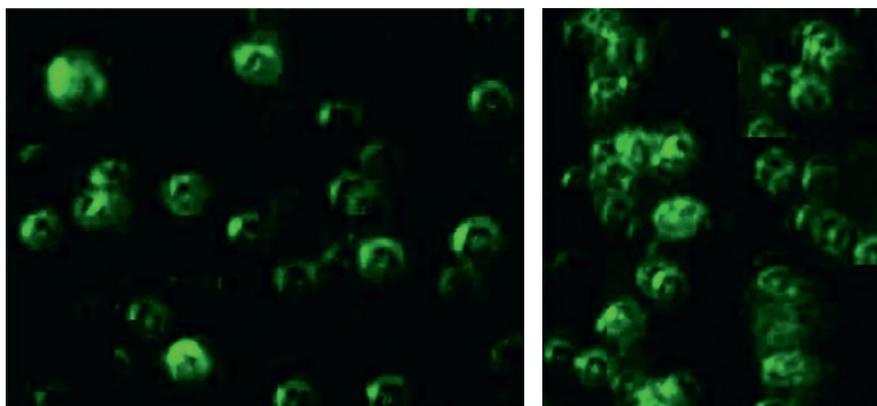
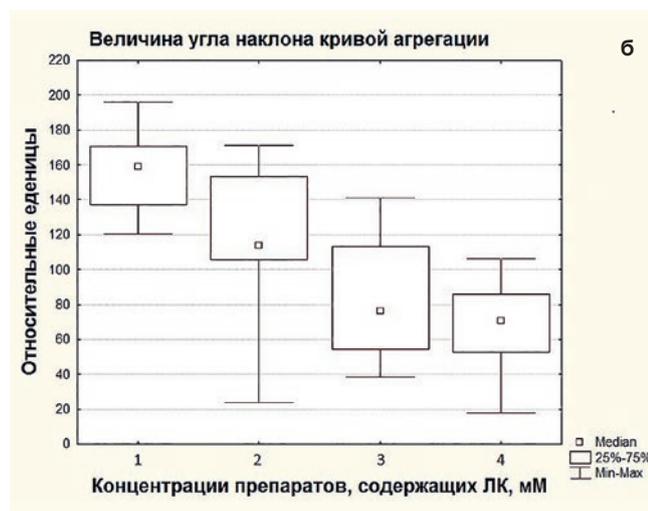
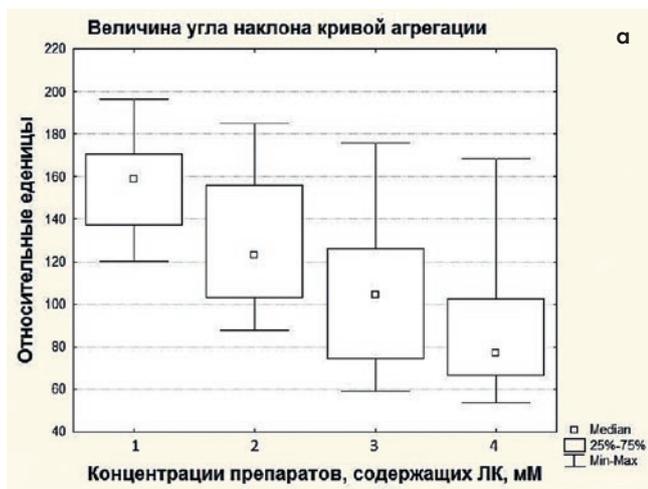


Рисунок 2. Свечение флуоресцентно-меченых липосом при взаимодействии с: а) тромбоцитами человека ( $3,5 \times 10^5$  кл/мл); б) тромбоцитарными агрегатами.

В ходе работы оценивались степень агрегации и скорость агрегации тромбоцитов. Кинетику агрегации регистрировали в течение 20 минут.

**Коагулограмма.** Определение влияния пустых липосом и содержащих альфа-липовую кислоту на плазменное звено гемостаза производилось на четырехканальном полуавтоматическом коагулометре TS 4000 (НТИ, США). Кровь собиралась в вакуумные пробирки с цитратом натрия.



Далее использовалась БТП, которая получалась путем центрифугирования крови при 2000 g 15 минут. При определении тромбинового времени каждая проба содержала 50 мкл БТП и 25 мкл дистиллированной воды (контроль) или 25 мкл липосом пустых и содержащих  $\alpha$ -ЛК разных концентраций, инкубация при 37°C две минуты при постоянном перемешивании. После добавлялся ренампластин с МИЧ 1,2 (для определения протромбинового времени) или тромбин 1,9 УНИ/мл (для определения тромбинового времени). Соотношение БТП: ренампластин и тромбин : ( $H_2O$  + липосомы) = 2 : 2 : 1.

АЧТВ: каждая проба содержала БТП, АЧТВ-реагент и дистиллированную воду (контроль) или липосомы, инкубация при 37°C три минуты при постоянном перемешивании. После добавлялось 0,025 М  $Ca^{2+}$ . Соотношение БТП : АЧТВ-реагент: ( $H_2O$  + липосомы) = 2 : 2 : 1.

**Статистическая обработка.** Полученные результаты обрабатывались с помощью программ Excel (Microsoft office) и STATISTICA версии 6, StatSoft (США). Для анализа различий количественных признаков в трех и более несвязанных группах использовался статистический критерий Краскелла-Уоллиса ANOVA, в двух несвязанных группах применялся критерий Манна-Уитни. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ . Результаты представили в виде боксов.

### Результаты и обсуждение

**Исследование влияния липосомальной формы липоевой кислоты на систему гемостаза человека.** Известно, что в процессе ишемического повреждения развивается воспалительная реакция как ответ организма на поврежде-

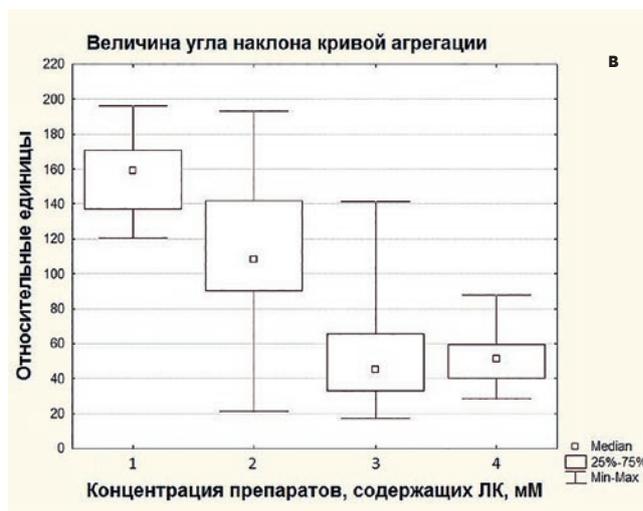


Рисунок 3. Угол наклона кривой агрегации: а — сравнение с контролем (1 — контроль; 2 — контроль + ФХ липосомы Сфх = 2 мМ, 3 — контроль + липосомы ЛК Слк = 1 мМ, 4 — контроль + водораств ЛК Слк = 1 мМ); б и в — сравнение с контролем липосом, загруженных ЛК в различных концентрациях (1–2 мМ). Величина кривой агрегации при различных концентрациях ФХ и ФХ с ЛК.

ние сосудистого эндотелия, а в случае инфаркта мозга происходит проникновение токсических веществ из сосудистого русла в мозговую ткань. Это вызывает запуск каскада оксидативных и прокоагулянтных реакций, в результате которых происходит активация клеток микроглии, что приводит к главной утрате — гибели жизненно важных нейронов с формированием инфарктного очага. Поэтому для предотвращения данного патологического процесса и снижения последствий от его наличия необходимо воздействовать на систему гемостаза, чтобы нарушить замкнутый сигнальный круг. К важнейшим проблемам современной медицины причисляют различные тромбоэмболические явления, которые возникают при избыточной активности тромбоцитов (Тц). Для лечения и профилактики ишемических нарушений кровообращения у больных применяют антитромбоцитарные антиагреганты препараты [11].

В предыдущих исследованиях было показано, что  $\alpha$ ЛК-липосомы никак не влияют на агрегацию тромбоцитов, вызванную добавлением АДФ и адреналина и слабо влияют на индукторы агрегации тромбоцитов, такие как коллаген, ристомидин. Максимальное влияние липосомальные конструкции, содержащие  $\alpha$ ЛК, оказывали на агрегацию, вызванную арахидоновой кислотой [12].

При добавлении липосом из ФХ-ФЛ меченых в обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) было обнаружено, что флуоресцентномеченые липосомы располагаются на поверхности тромбоцитов (рис. 2 а). Было зарегистрировано образование клеточных агрегатов с флуоресцентномечеными липосомами, которые, судя по всему, встраиваются клеточную мембрану тромбоцитов (рис. 3 б).

В ходе проведенных исследований агрегации тромбоцитов было обнаружено, что фосфатидилхолиновые липосомы с концентрациями 2, 3, 4 мМ уменьшают агрегацию Тц на 12, 20 и 25 % в зависимости от концентрации ФХ-липосом, в то время как добавление только индуктора вызывало агрегацию 95 % (рис. 3). Липосомы, содержащие  $\alpha$ -ЛК с концентрациями 1, 1,5, 2 мМ, снижали агрегацию на 13, 22, 30 % в зависимости от концентрации  $\alpha$ -ЛК. При этом водорастворимые формы  $\alpha$ ЛК с концентрацией 1 мМ практически не снижали агрегацию, а с концентрацией 1,5 и 2 мМ снижали ее на 10–12 % (рис. 3). Вероятнее всего, это связано с плохой способностью проникать в клетку водора-

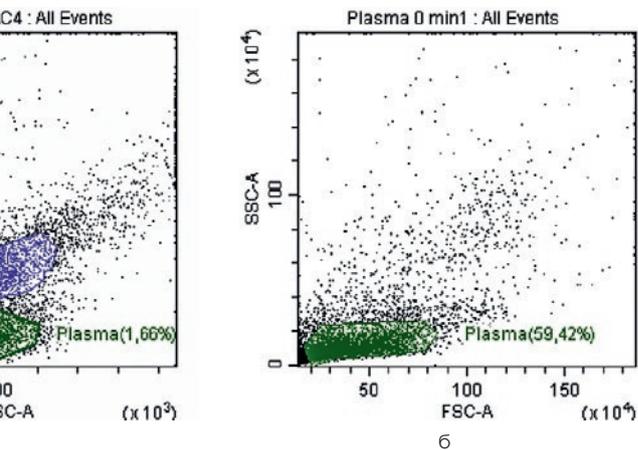


Рисунок 4. Двухмерная гистограмма отношения бокового и фронтального светорассеяния: а — тромбоцитов и компонентов плазмы; б — плазмы, выделенной из периферической крови человека.

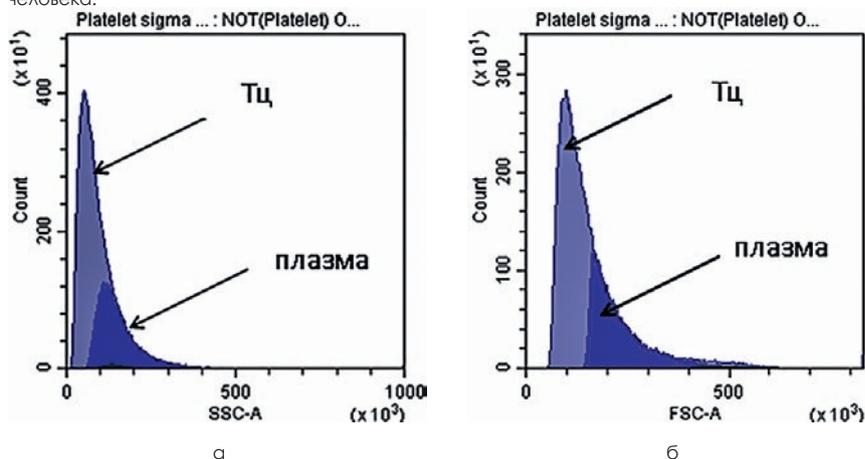


Рисунок 5. Гистограмма зависимости: а — количества клеточных элементов от бокового светорассеяния; б — количества клеточных элементов от прямого светорассеяния.

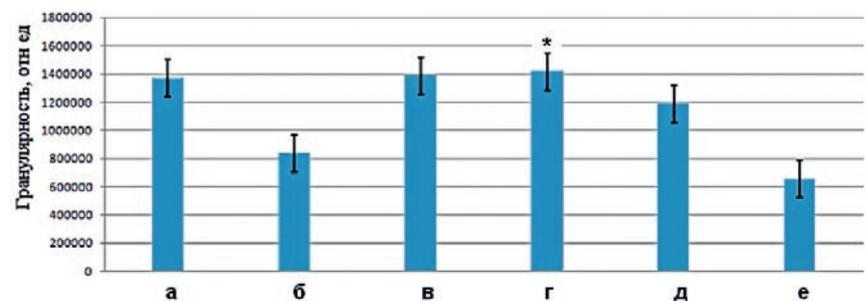


Рисунок 6. Влияние липосом, содержащих  $\alpha$ -липовую кислоту, на гранулярность клеточных элементов: а) тромбоциты; б) тромбоциты + арахидоновая кислота; в) фосфотидилхолиновые липосомы (2 мМ) + тромбоциты + арахидоновая кислота; г) липосомы с липовой кислотой (1 мМ) + тромбоциты + арахидоновая кислота; д) тромбоциты + раствор липовой кислоты в физиологическом растворе (1 мМ) + арахидоновая кислота; е) тромбоциты + этилендиаминовая соль липовой кислоты (1 мМ) + арахидоновая кислота. Длина волны возбуждения 488 нм.

створимых препаратов, содержащих  $\alpha$ -ЛК. Кроме того, по-видимому, липосомы, содержащие  $\alpha$ -ЛК, способны легко проникать через клеточную мембрану за счет их слияния с клеточной мембраны и высвобождать препарат во внутриклеточное пространство.

В ходе проведенных исследований при расчете кривой агрегации в исследуемых образцах крови доноров обнаружено, что как и  $\alpha$ -липовая кислота в составе липосомальных конструкций, так и водорастворимая форма ЛК в виде этилендиаминовой соли достоверно влияли

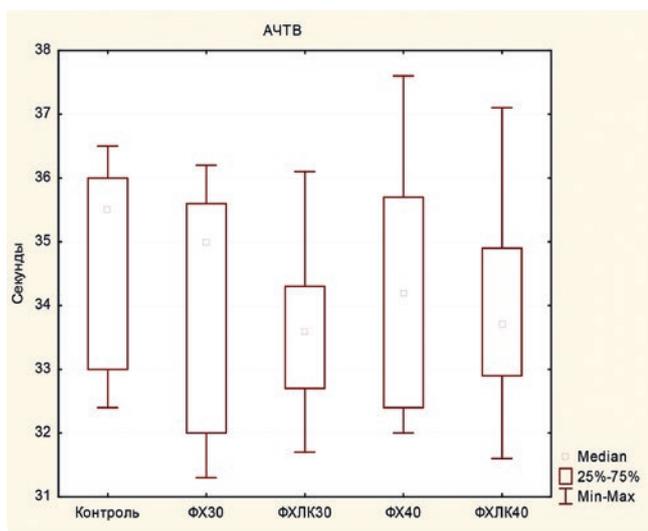


Рисунок 7. Влияние липосом без ЛК и содержащих  $\alpha$ -липоевую кислоту на АЧТВ (ФХ30 = 4,8 мг/мл = 6 мМ; ФХ40 = 6,4 мг/мл = 8 мМ; ФХЛК30 = 0,6 мг/мл = 3 мМ; ФХЛК40 = 0,8 мг/мл = 4 мМ).

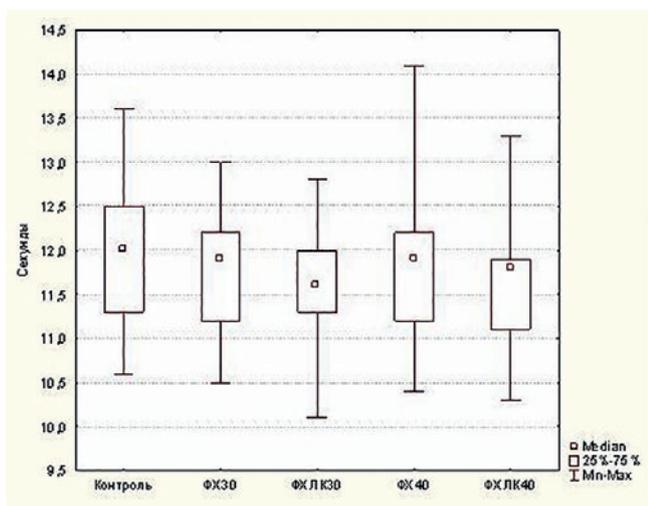


Рисунок 8. Влияние липосом без ЛК и содержащих  $\alpha$ -липоевую кислоту на тромбиновое время (ФХ30 = 4,8 мг/мл = 6 мМ; ФХ40 = 6,4 мг/мл = 8 мМ; ФХЛК30 = 0,6 мг/мл = 3 мМ; ФХЛК40 = 0,8 мг/мл = 4 мМ).

на величину угла наклона агрегации при концентрации  $\alpha$ -ЛК 2 мМ (рис. 3), тогда как в концентрациях 1 и 1,5 мМ отличия не значимы (рис. 3). Полученные результаты позволяют сказать, что ЛК С = 2 мМ в составе липосом эффективней уменьшала скорость агрегации Тц (рис. 3).

При исследовании влияния липосомальной формы ЛК на функциональную активность тромбоцитов методом проточной цитофлуорометрии была получена двумерная гистограмма отношения бокового и прямого светорассеяния плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (рис. 4 а), и плазмы, обедненной тромбоцитами (рис. 4 б). Как мы видим на этом рисунке, регистрируются две фракции: тромбоциты и компоненты плазмы (рис. 4 а). Для сравнения и дальнейшей обработки результатов исследований приведена двумерная гистограмма отношения бокового и прямого светорассеяния, в которой отсутствует тромбоцитарная фракция (компоненты обедненной тромбоцитами плазмы) (рис. 4 б).

Обработка данных по прямому и боковому светорассеянию тромбоцитов и плазменных компонентов дала

следующие результаты (рис. 5). Как можно наблюдать, интенсивность светорассеяния тромбоцитарной фракции значительно превосходит интенсивность светорассеяния плазменных компонентов, поэтому в дальнейшем при обработке полученных результатов экспериментов мы не учитывали вклад интенсивности (фона) от обедненной плазмы тромбоцитов (рис. 5).

При исследовании изменения гранулярности тромбоцитов в образцы с обогащенной тромбоцитами плазмы добавляли ФХ липосомы не содержащие ЛК, или липосомы с ЛК, или водорастворимые препараты с  $\alpha$ -липоевой кислотой, в дальнейшем инкубировали в течение пяти минут ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) и добавляли индуктор агрегации Тц арахидоновую кислоту (рис. 6).

Добавление арахидоновой кислоты приводило к снижению гранулярности тромбоцитов в отличие от препаратов, содержащих как пустые липосомы так и липосомы с включенными в них  $\alpha$ -ЛК. При этом при добавлении водорастворимой формы  $\alpha$ -ЛК происходило незначительное уменьшение гранулярности клеток, а в случае с  $\alpha$ -ЛК-этилендиаминовой солью происходило значительное снижение грануляции. Полученные данные свидетельствуют, что липосомальные формы препятствовали дегрануляции тромбоцитов (рис. 6).

В результате данных исследований было показано, что добавление арахидоновой кислоты уменьшало гранулярность тромбоцитов по сравнению с нативными тромбоцитами (рис. 6). Добавление липосомальных препаратов, содержащих  $\alpha$ -липоевую кислоту, приводило к увеличению гранулярности тромбоцитов. При этом при добавлении  $\alpha$ -липоевой кислоты, растворенной в физиологическом растворе, происходило незначительное уменьшение гранулярности клеток. Применение этилендиаминовой соли ЛК приводило к значительному снижению грануляции (рис. 6). По-видимому, полученные результаты можно объяснить следующим образом. Добавление арахидоновой кислоты к нативным тромбоцитам приводило к увеличению проницаемости мембран тромбоцитов, а следовательно, к быстрому высвобождению всех микроструктурных компонентов (гранул) клеток. Добавление водорастворимых препаратов никак не повлияло на стабилизацию липидного бислоя мембраны и ее проницаемость. Сами как пустые фосфатидилхолиновые липосомы, так и липосомы с  $\alpha$ -липоевой кислоты приводили к уменьшению высвобождению тромбоцитарных гранул вследствие стабилизации липидного бислоя мембраны клеток и уменьшения их текучести. Поэтому из полученных данных исследований можно сделать вывод о том, что липосомальные формы препятствуют дегрануляции тромбоцитов по сравнению с водорастворимыми препаратами липоевой кислоты (рис. 6).

**Изучение влияния липосом с  $\alpha$ -ЛК на параметры коагуляционного гемостаза.** При исследовании влияния пустых липосом и липосом содержащих,  $\alpha$ -ЛК на параметры, отражающие состояние гемостаза получены следующие результаты.

На рис. 7 и 8 представлено влияние ФХ-липосом и липосом, содержащих  $\alpha$ -липоевую кислоту на АЧТВ

и тромбиновое время. Как мы видим, липосомальные формы практически не влияют на АЧТВ с высокой достоверностью.

Аналогичные результаты были получены по влиянию ФХ-липосом и липосом содержащих  $\alpha$ -липовую кислоту, на МНО. Как видно на рис. 9, липосомальные формы достоверно не влияют на МНО.

### Заключение

Таким образом, методами флуоресценции и проточной цитометрии получены экспериментальные данные о влиянии липосомальной формы  $\alpha$ -ЛК на систему свертывания крови человека. Липосомы ФХ и липосомы, содержащие  $\alpha$ -ЛК, не влияли на тромбиновое время МНО, АЧТВ. Показано, что липосомальная форма  $\alpha$ -липовой кислоты при концентрациях 0,2–0,4 мг/мл дозозависимо подавляет агрегацию тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы крови человека, индуцированную арахидоновой кислотой, препятствует снижению гранулярности тромбоцитов и не оказывает достоверного влияния на плазменное звено гемостаза.

### Список литературы

1. Moskowitz M. A., Lo E. H., Iadecola, C. // *Neuron*. 2010. Vol. 67. P. 181–198. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.019> showArticle Info.
2. Wang J. Y., Zhou D. H., Li J., et al. // *Cerebrovasc Dis*. 2006. Vol. 21(1–2). P. 67–73.
3. Yanying Miao, James K. Liao. // *Expert Rev Neurother*. 2014. Vol. 14(2). P. 173–185. doi: 10.1586/14737175.2014.875471.
4. Rallidis L. S., Zolindaki M. G., Vikelis M., Kaliva K., Papadopoulos C., Kremastinos D. Th. // *Int J Cardiol*. 2009. Vol. 132(2). P. 216–220. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.11.031>.
5. Attila Mocsai, BarbaraWalzog, Clifford A. Lowell. // *Cardiovascular Research*. Vol. 107. P. 373–385. doi: 10.1093/cvr/cvv159.

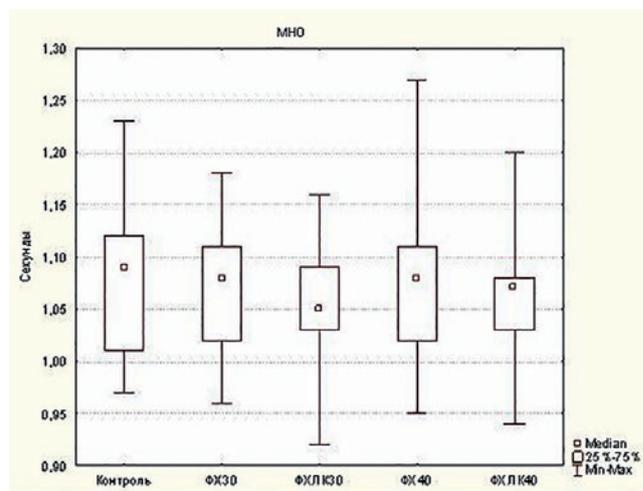


Рисунок.9. Влияние липосом без ЛК и содержащих  $\alpha$ -липовую кислоту на МНО (ФХ30 = 4,8 мг/мл = 6 мМ; ФХ40 = 6,4 мг/мл = 8 мМ; ФХЛК30 = 0,6 мг/мл = 3 мМ; ФЛК40 = 0,8 мг/мл = 4 мМ).

6. Castillo J., Alvarez-Sabán J., Martínez-Vila E., et al. // *Neurol J*. 2009. Vol. 256(2). P. 217–224.
7. Sahota P., Savitz S. I. // *Neurotherapeutics*. Vol. 8. № 3. P. 434–51. doi:10.1007/s13311-011-0040-6.
8. Saver J. L. // *Rev Neurol Dis*. 2010. Vol. 7. № 1. P. 14–21.
9. Соловьева Э. Ю., Миронова О. П., Федин А. И. // *Consilium Medicum*. Т. 5. № 6. С. 30–35.
10. Macey M. G. // *Flow cytometry: principles and applications*. NJ.: Humana Press, Totowa.— 2007. P. 289.
11. Котова О. В., Акарачкова Е. С. // *Фарматека*. 2010. № 8 С. 57–61.
12. Щелконогов В. А., Сорокоумова Г. М., Баранова О. А., Чеканов А. В., Ключкова А. В., Казаринов К. Д., Соловьева Э. Ю., Федин А. И., Швец В. И. // *Биомедицинская химия*. 2016. Т. 62. № 5. С. 577–583. doi: 10.18097/PBMC20166205577.

ЛабМетод

THARMAC

# Cellspin

## Цитоцентрифуги

Получение тонкослойных и многослойных клеточных препаратов



ООО «Лабметод Лтд», 117209, г. Москва, ул. Зюзинская, д. 6, корп. 2, оф. 132  
Тел. (495) 721-05-58, 332-35-15, 332-36-45, факс (495) 332-35-51  
e-mail: [tnb@labmetod.ru](mailto:tnb@labmetod.ru), [pmv@labmetod.ru](mailto:pmv@labmetod.ru), <http://www.labmetod.ru>