

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ «ЛИПОФЕРОЛ» В МЕДИЦИНЕ

Шанская А.И., Пучкова С.М., Недачина Н.А.

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии ФМБА», Санкт-Петербург, 191024, 2-я Советская ул., д. 16,
тел. (812) 274-56-50, E.mail: bloodscience@mail.ru*

Резюме: В работе представлены данные физико-химических свойств и результаты доклинического изучения липосомального препарата Липоферол. Показана его лечебная эффективность на моделях геморрагического и ожогового шока у кроликов и собак. После инфузий Липоферола улучшаются показатели системной гемодинамики и кислородного режима организма. Препарат Липоферол обладает выраженным антиоксидантным действием, снижает интенсивность процессов ПОЛ. На модели токсического поражения печени у крыс был показан гепатопротекторный эффект Липоферола. Препарат безвреден, не вызывает аллергических реакций, не оказывает отрицательного воздействия на функциональную активность жизненно важных органов и систему гемостаза.

Ключевые слова: липосомы, соевый лецитин, кислые фосфолипиды сои, витамин Е, антиоксиданты, Липоферол.

THE POSSIBLE APPLICATIONS OF LIPOSOME PREPARATION FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION "LIPOFEROL" IN MEDICINE

Shanskaja A.I., Puchkova S.M., Nedachina N.A.

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg, 191024,
2nd Sovietskaya str., 16;*

Summary: This paper presents the physical and chemical properties and the results of pre-clinical study of liposomal drug Lipoferol. Shows its therapeutic efficacy in models of hemorrhagic and burn shock in rabbits and dogs. After infusion Lipoferol improves systemic hemodynamics and oxygen regime of the body. The drug Lipoferol has a strong antioxidant effect, reduces the intensity of lipid peroxidation. On the model of liver toxicity in rats was

shown hepatoprotective effect Lipoferol. The drug is harmless, do not cause allergic reactions, no adverse effect on the functional activity of vital organs and the hemostatic system.

Keywords: liposomes, soy lecithin, acid phospholipids of soybean, vitamin E, antioxidants, Lipoferol.

Введение

Несмотря на имеющиеся достижения, исследователи продолжают вести поиск по созданию новых классов лекарственных средств с улучшенными фармакологическими свойствами, что составляет одно из актуальных направлений медико-биологической науки.

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в разработке лечебных средств и методов, применяемых при неотложных состояниях, тяжелых травмах и других экстремальных ситуациях. В настоящее время одним из перспективных направлений в развитии медицинской технологии в области разработки лекарственных препаратов являются нанотехнологии, направленные на создание наночастиц и различных композиций на их основе. В медицине возможности нанотехнологий нацелены на управление с помощью наноматериалов и наночастиц физическими и биологическими процессами, протекающими в живых организмах на молекулярном уровне [1].

Одним из видов наночастиц, применяемых в биологии и медицине, являются липосомы, представляющие собой наносферы водной субстанции, заключенные в липидную оболочку [2]. Среди множества липидов, существующих в природе, наиболее биологически значимыми являются фосфолипиды (ФЛ). Полученные на их основе фосфолипидные наночастицы имеют ряд преимуществ перед другими, например, полимерными частицами. Успех применения липосом обусловлен тем, что они эффективно связывают и высвобождают лекарственное вещество, облегчают всасывание и прохождение его через биологическую мембрану, обеспечивают интактность до взаимодействия с клетками-мишенями [3,4].

Липосомы – биodeградебельны, не вызывают антигенных реакций, снижают токсичность инкапсулированных веществ, пролонгируют их действие в организме, доставляя лекарственное вещество непосредственно в клетку.

Липосомы представляют собой бислойные сферические образования, получаемые при механическом воздействии на дисперсию фосфолипидов в воде. Свойства липосом в большей степени определяются химическим составом липидного бислоя. Оболочка липосом состоит из молекул тех же природных фосфолипидов, что входят в состав клеточных мембран. Мембраны играют главную роль в системе биологической коммуникации, благодаря специфическим рецепторам, воспринимающим внешние стимулы. Фосфолипиды – основной класс мембранных липидов [5]. Природные фосфолипиды отличаются высокой физиологической толерантностью, легко метаболизируются и часто используются в качестве строительного материала для получения липосом. Фосфолипиды относятся к природным антиоксидантам и проявляют антиокислительную активность, инактивируя ионы тяжелых металлов, попадающие в организм из атмосферы и с пищей [6]. Фосфолипиды, в составе липидного бислоя, образующего мембраны, регулируют энергоснабжение клеток, обеспечивают их кислородом и способствуют передаче информации между ними [7]. Сходство растительных фосфолипидов с фосфолипидами человека обуславливают их способность, встраиваясь в биомембраны клеток, предупреждать широкий ряд возможных патологических процессов [8].

Из природного сырья растительного происхождения преимущество отдают соевым фосфолипидам [5].

Основным ингредиентом липосом является фосфатидилхолин (ФХ), который в комплексе с другими фосфолипидами, в том числе отрицательно заряженными, приводит к увеличению внутреннего объема липосом и, следовательно, к увеличению объема инкапсулирования лекарственных средств. Рядом авторов также показано, что включение в состав липидного слоя липосом анионных фосфолипидов (фосфатидилэтанола, инозитфосфатида) увеличивает стабильность липосомальной везикулы, так как они придают мембране отрицательный заряд, предотвращающий агрегирование везикул и их прилипание к стенкам сосудов [8,9].

Большой интерес представляет введение в липидный бислой липосом α -токоферола. Установлено, что α -токоферол оказывает холестериноподобное действие на физическое состояние липидного бислоя: упорядочивает ненасыщенные бислои и разупорядочивает насыщенные бислои.

Установлено, что входящий в состав клеточной мембраны α -токоферол устраняет хаотропное (разжижающее) действие свободных жирных кислот (СЖК) на бислой [10].

Эффект стабилизации носит общий характер и зависит от химического строения функциональных полярных групп фосфолипидов, степени ненасыщенности СЖК и жирнокислотных остатков, входящих в состав фосфолипидов. Способность α -токоферола образовывать комплексы с СЖК лежит в основе защиты мембран от повреждающего действия СЖК, особенно в условиях патологии.

Таким образом, профилактика повреждения мембран и дезактивация процесса свободнорадикального окисления может быть обеспечена с помощью композиции фосфолипидов и α -токоферола.

В последние годы большое внимание уделяется разработке методов коррекции перекисного окисления липидов (ПОЛ) при помощи препаратов со свойствами антиоксидантов.

Высокая биоантиоксидантная эффективность α -токоферола в мембранах связана не просто с реакцией обрыва цепи. При взаимодействии α -токоферола с перекисными радикалами происходит возвращение структуры углеводородной цепи в ее исходное состояние. Защищая мембраны от ПОЛ, α -токоферол обеспечивает выполнение мембранами их многочисленных функций в широком диапазоне температур [10].

Установлено, что при недостатке витамина Е (α -токоферол) в организме могут накапливаться токсические продукты обмена жиров, нарушается нормальная деятельность желез внутренней секреции (передней доли гипофиза, щитовидной железы и др.), утрачивается способность организма накапливать во внутренних органах запасы других жирорастворимых веществ. В норме при достаточном сбалансированном питании в человеческом организме α -токоферол находится в некотором запасе, что позволяет поддерживать его необходимый уровень длительное время и предохраняет организм от резкого наступления авитаминоза.

Нарушение свободно-радикальных процессов сопровождается изменением уровня ПОЛ и соответствующей перестройкой эндогенных систем регуляции процессов свободно-радикального окисления.

Создание лекарственного препарата на основе липосом, содержащего α -токоферол – природный антиоксидант и стабилизатор мембран, позволит доставлять его непосредственно в клетку и, тем самым, повышать эффективность мембранопротектирующего действия и стабилизацию процессов ПОЛ в патогенетической терапии. Следует отметить, что до настоящего времени отсутствуют препараты с α -токоферолом для внутривенного введения.

Цель исследования

Обоснование необходимости создания липосомального препарата с α -токоферолом.

Материалы и методы

Липоферол это липосомальный препарат для внутривенного введения с размером частиц до 100 нм, который содержит фосфолипиды сои и антиоксидант α -токоферол.

Физико-химические свойства липосомального препарата Липоферол определяли общепринятыми методами по основным параметрам фармакопейной статьи предприятия (ФСП) в соответствии с Государственной Фармакопеей XI и XII издания: подлинность, цветность, вязкость, плотность, дисперсность, перекисное и кислотное число, pH, сухой остаток, определение азота, количественное определение фракций фосфолипидов и содержание α -токоферола, токсичность, стерильность и др.

Проведено доклиническое исследование безвредности препарата с учетом «Правил доклинической оценки безопасности фармакологических средств GLP» (1998) на 3-х видах животных (собаки, кролики и крысы). По общепринятым методам изучали влияние препарата на функциональную активность жизненно важных органов (сердце, печень, почки и др.) и на свертывающую систему организма. Лечебную эффективность исследовали на моделях геморрагического и ожогового шока у кроликов и собак, а также на модели токсического гепатита у крыс, вызванного введением 4-х хлористого углерода. Препарат Липоферол вводили внутривенно в дозе 6,0 мл/кг массы тела животного. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем физиологического раствора хлорида натрия. Показатели снимали через 30 и 120 минут после инфузии препарата. Изучали параметры системной гемодинамики (минутный объем кровообращения, сердечный индекс, ударный объем сердца и др.) и кислородного режима, а также показатели перекисного окисления липидов: уровень диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови животных.

Полученные в ходе экспериментов данные статистически обработаны общепринятыми методами. Достоверность результатов оценивалась с применением критерия Стьюдента. Различие считали достоверным при вероятности 95% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В лаборатории жировых эмульсий РосНИИГТ (СПб) создан липосомальный препарат для внутривенного введения Липоферол с высоким содержанием α -токоферола. Липоферол представляет собой липосомальную эмульсию из фармакологически известных компонентов: лецитина соевого, кислых фосфолипидов сои, α -токоферола, D-сорбита, набора солей (фосфатов калия, натрия), используемых в клинической практике. Жесткие требования предъявляются к размеру липосомальных везикул, размер основной массы которых должен быть меньше 100 нм, для предотвращения эмболии сосудов микроциркуляторного русла.

Все экспериментальные серии липосомального препарата с высоким содержанием α -токоферола контролировались по физико-химическим показателям как в момент получения, так и в процессе хранения. Все полученные серии препарата Липоферол соответствовали требованиям ФСП. Результаты исследований показали, что физико-химические характеристики липосом, содержащих высокий процент α -токоферола, в процессе хранения практически не изменяются. В течение 2-х лет препарат остается стерильным, нетоксичным, апиногенным.

Проведено широкое доклиническое изучение Липоферола по правилам GLP. Рекомендуемая терапевтическая доза при проведении эксперимента составляла 6,0 мл препарата на кг массы тела животного, что в пересчете на α -токоферол составляет 50 мг на кг массы тела.

Определить LD 50 не удалось, так как введение α -токоферола в дозе в 20 раз превышающей терапевтическую дозу не приводило к гибели животных, а дальнейшее увеличение объема вводимого препарата невозможно из-за опасности возникновения гиперволемии. При многократном введении Липоферола животным доказано отсутствие острой и хронической токсичности и влияния на периферическую систему крови и гемостаза [11].

Многократные вливания животным Липоферола (14 суток) показали, что белковообразовательная и синтетическая функция печени сохранены. Так, исходные показатели общего белка в сыворотке крови животных были $76,80 \pm 1,28$ г/л, а через 14 суток – $76,40 \pm 0,60$ г/л. Отсутствие изменений в концентрации мочевины на протяжении всего периода эксперимента (исходные значения $4,8 \pm 0,2$ ммоль/л, через 14 суток – $4,7 \pm 0,4$ ммоль/л) свидетельствует и о сохранении выделительной и концентрационной способности почек, одной из основных функций которых является удаление продуктов азотистого обмена.

Изучение функции сердечной мышцы до и после введения Липоферола собакам показало, что во все периоды эксперимента синусовый нормотропный ритм сердечных сокращений сохранялся. После инфузии Липоферола через 30 и 120 минут несколько возрастала частота сердечных сокращений. В эти периоды наступало и укорочение времени электрической диастолы сердца (ТР). Время электрической систолы желудочков (Q,R,S,T) оставалось практически неизменным. Не отмечено изменение величины зубцов ЭКГ (P,Q,R,S,T). Через 24 часа после инфузии препарата значение ЭКГ практически не отличалось от исходного, что показывает отсутствие каких-либо неблагоприятных воздействий Липоферола на миокард, проводящую и сосудистую систему сердца у собак.

При патогистоморфологическом исследовании внутренних органов экспериментальных животных не выявлены изменения в структуре органов. Весовые индексы их оставались в пределах исходных значений.

Изучение специфических видов токсичности Липоферола показало, что препарат не обладает алергизирующим действием и не угнетает активность иммунной системы организма.

При изучении лечебной эффективности Липоферола в опытах на животных при экспериментальном ожоговом шоке установлено, что введение липосом способствовало коррекции гемодинамических расстройств: восстанавливалось артериальное давление, ударный объем, сердечный выброс, общее периферическое сопротивление кровотоку в большей степени, чем при инфузии одного изотонического раствора натрия хлорида. Липоферол оказывал антиоксидантное действие, снижая активность процессов пероксидации. Ингибирование процессов ПОЛ и снижение содержания недоокисленных продуктов, играющих важную роль в повышении проницаемости биомембран, способствовали, скорее всего, уменьшению интерстициального отека в легких, что приводило к повышению диффузии кислорода и, тем самым, к восстановлению кислородного режима организма. Улучшение кислородного режима организма может быть связано также и с коррекцией липосомами метаболических нарушений, в частности, восстановлением фосфолипидов митохондриальных мембран и улучшением процессов тканевого дыхания. Существенное значение для нормализации клеточного метаболизма имеют входящие в состав Липоферола фосфолипиды сои, служащие строительным материалом для регенерации структуры клеточных мембран. Кроме того, существенно снижались явления токсемии, уменьшалась активность катепсина Д в крови, а также отмечалась стабилизация лизосомальных мембран. Показателем лечебной эффективности

липосом было и увеличение продолжительности жизни тяжело обожженных животных по сравнению со сроками жизни кроликов, которым переливали изотонический раствор натрия хлорида [12,13].

Выраженный гепатопротекторный эффект Липоферола установлен на модели повреждения печени животных четырех хлористым углеродом (CCl₄). Нашими исследованиями показано, что вводимые в состав препарата Липоферол очищенные фосфолипиды сои восстанавливают нарушенный при токсическом поражении печени фосфолипидный профиль мембран митохондрий печени и эритроцитов, способствуя нормализации их функций и обеспечивая усиление регенерационных процессов в печени.

Многофункциональность липосом, выявленная при разной экспериментальной патологии, позволяет рассчитывать на их успешное применение при инфузионной терапии в клинике.

Заключение

В заключение необходимо отметить, что, несмотря на многолетние исследования липосом в качестве лекарственных носителей, промышленный выпуск липосомальных препаратов, особенно для внутривенного введения, ограничен, что с нашей точки зрения, вызвано особенностями и сложностью технологии их получения. Поэтому создание липосомальных лекарственных форм для внутривенного введения для широкого клинического применения – актуальная задача медицины.

Литература

1. Арчаков А.И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанолекарства // Биомедицинская химия. – 2010. – №1. – С. 7-25.
2. Зиганшин А.У., Зиганшина А.Е. Наночастицы: фармакологические надежды и токсикологические проблемы // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. LXXXX, № 1. – С. 1-7.
3. Толгева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биологический журнал. – 2006. – № 1. – С. 54-61.

4. Назаров Г.В., Галан С.Е. и др. Наноразмерные формы лекарственных соединений (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 3. – С. 41-48.
5. Rickword D., Hames B.D. Liposomes a practical approach // Oxford University Press, New York. – 1990.
6. Лисицин А.Н., Григорьева В.Н. Особенности окисления и антиоксидантных свойств фосфолипидов // Сб. докл. 10-й Междунар. конф. «Масложировая индустрия-2010». – СПб. – 2010. – С. 127-130.
7. Ryota Hosomi, Kenji Fukunaga, Hiromi Arai, ets. Effect of phospholipids n-3polyunsaturated fatty acids on rat lipid metabolism // Eur. J. Lipid Sci/Technol. – 2010. – Vol. 112. – P. 537-544.
8. Ипатова О.М. Прозоровская Н.Н., Терхивская Н.Н., Баранова В.с., Гусева Д.А. Биологическая активность соевых фосфолипидов // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 436-450.
9. Жукова М.В., Кисель М.А. и др. Инкапсулирование доксорубина в липосомы, содержащие фосфатидилэтаноламин. Физико-химическая характеристика и противоопухолевая активность жидкокристаллических липосом // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 31-33.
10. Абрамова Ж.И. Оксенгендлер Г.И. Человек и противокислительные вещества. – Л.: «Наука», 1985. – С. 28-34, 41-45, 74-78.
11. Шанская А.И., Белязо О.Е., Булушева Е.В., Яковлева Т.Е., Папаян Л.П. Изучение влияния липосомальных препаратов на агрегационные свойства тромбоцитов доноров // Тез. Республиканской конф. «Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии». – СПб. – 1995. – С. 132-133.
12. Kochetygov N.I., Makeev A.B., Petrova I.A., Bulusheva E.V., Shanskaya A.I. Study of the efficacy of liposomes in experimental burnshock // 9th Congress of the International Society for Burn Injuries. – France. – Paris. – 27 June-1 July 1994.
13. Кочетыгов Н.И., Шанская А.И., Яковлева Т.Е., Булушева Е.В., Ремизова М.И. и др. Новый лечебный препарат антиоксидантного действия – Липоферол // Тез. научно-практ. конф. с международным участием «Свободные радикалы и болезни человека». – Смоленск. – 1999. – С. 64-66.