

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОГЛОЩЕНИЯ И СУБКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПОСОМ В ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Мухамадияров Р.А.¹, Гхат М.², Халиулин И.Г.³, Борисов В.В.¹, Кудрявцева Ю.А.¹, Журавлёва И.Ю.¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6, rem57@rambler.ru

² Nirma University, Institute of Pharmacy, 382481, India, Sarkhej-Gandhinagar Highway, Ahmedabad

³ University of Bristol, School of Clinical Science, United Kingdom, Level 7, Bristol Royal Infirmary, Bristol, BS2 8HW

Проведена сравнительная оценка поглощения и субклеточного распределения липосом в печени крыс в норме и при хронической печеночной недостаточности (ХПН), обусловленной венозным застоем. Животным внутривенно вводили пустые липосомы (ПЛ) или липосомы, дополнительно содержащие в своем составе α -токоферол (ТФЛ). Оба вида липосом содержали в качестве радиоактивной метки ³H-лецитин. Поглощение и распределение липосом оценивали по активности трития в образцах печени и ее субклеточных фракциях. Показано, что оба типа липосом поглощаются печенью крыс как в норме, так и при ХПН. У интактных животных через 1 ч после введения ПЛ либо ТФЛ в печени регистрировали около 70% от введенной метки. В группе животных с ХПН в течение первого часа после введения в печень определяли около 75% метки при введении ТФЛ и около 60% при введении ПЛ, что свидетельствует о сохранении печенью при ХПН способности к поглощению липосом. В течение первых 6 часов снижение активности метки липосом в печени животных с ХПН происходило медленнее, по сравнению с интактными. Модификация липосомальной мембраны включением в нее α -токоферола влияла как на поглощение липосом клетками, так и на внутриклеточное их распределение. В частности, в обеих группах животных отмечено увеличение тропности ТФЛ к митохондриям по сравнению с ПЛ. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что липосомальные композиции могут быть использованы для доставки БАВ в клетки как в норме, так и при заболеваниях печени и могут служить основой для разработки высокоэффективных фармацевтических препаратов для внутриклеточной терапии.

Ключевые слова: липосомы, митохондрии, гепатопротекция.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF LIPOSOMAL ABSORPTION AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION IN RAT LIVER IN NORMAL CONDITIONS AND IN CHRONIC HEPATIC INSUFFICIENCY

Mukhamadiyarov R.A.¹, Ghate M.², Khaliulin I.G.³, Borisov V.V.¹, Kudrjavitseva J.A.¹, Zhuravleva I.J.¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences 6 Sosnovy bld. Kemerovo 650002 Russian Federation, rem57@rambler.ru

² Nirma University, Institute of Pharmacy, 382481, India, Sarkhej-Gandhinagar Highway, Ahmedabad

³ University of Bristol, School of Clinical Science, United Kingdom, Level 7, Bristol Royal Infirmary, Bristol, BS2 8HW

Liposomal absorption and subcellular distribution in the rat liver in normal conditions and in chronic hepatic insufficiency (CHI) due to venous congestion were compared. The rats were intravenously administered with empty liposomes (EL) and α -tocopherol containing liposomes (TL). Both liposomal types contained ³H-lecithin as a radioactive label. Liposomal absorption and distribution were assessed by the tritium activity in the liver sample and its subcellular fractions. It was found that either type of liposomes is absorbed both by the normal and diseased liver. Intact rats showed around 70% of the label in the liver 1h after EL or TL administration. CHI rats had around 75% and 60% of the label within 1h after TL and EL administration, respectively, which demonstrated the preserved ability of the affected liver to absorb liposomes. During the first 6 hours the slow-down of the liposomal label activity was slower in CHI rats. Liposomal membrane modification by incorporating α -tocopherol had an impact both on liposomal absorption and cellular distribution. In particular, both groups showed higher affinity of TL to mitochondria as compared to EL. Thus, the results suggest that liposomal compositions can be used for targeted delivery of biologically active substances both in normal and diseased liver and can be the basis for the development of highly effective pharmaceuticals for intracellular therapy.

Key words: liposomes, mitochondria, hepatoprotection.

В настоящее время липосомальные фармацевтические препараты применяют как средство доставки лекарственных веществ к пораженным органам. Включение биологически активных веществ в липосомы позволяет осуществлять их направленный транспорт, снижать токсичность, защищать от разрушения ферментами крови [12; 13].

Поглощение липосом органами, с одной стороны, зависит от особенностей структуры самих липосом (размер, заряд поверхности, структурная жесткость бислоя, модификации мембраны факторами крови, наличием на поверхности полисахаридов или белков и др.) [6; 11; 13], с другой стороны – от особенностей структуры самого органа: строения сосудистого русла, наличия и размеров фенестров в капиллярах, присутствия макрофагальных клеток [6; 7; 13].

Известно, что при внутривенном введении немодифицированных липосом наибольшая часть их поглощается различными клетками печени [6; 11]. Это свойство позволяет использовать липосомы для адресной доставки препаратов в данный орган. Несмотря на большой интерес к этой проблеме, процесс поглощения липосом печенью хорошо изучен только в экспериментах с интактными животными. Вопросы о поглощении и распределении липосом при патологических процессах в печени в настоящее время остаются открытыми.

При использовании липосом для доставки биологически активных веществ к тканям и клеткам большое значение имеет последующее распределение липосом внутри клеток. Повреждения клеток, обусловленные патологическими процессами, сопровождаются дисфункцией субклеточных органелл [9; 10]. Поэтому при создании современных фармацевтических препаратов большое значение приобретает адресная доставка молекул непосредственно к поврежденным субклеточным структурам.

В настоящем исследовании в качестве модельного фармацевтического препарата для оценки липосомального транспорта липофильных веществ в печень был избран α -токоферол, так как он нерастворим в водных средах и не может быть введен непосредственно в кровоток. Вместе с тем он известен как важнейший естественный антиоксидант.

Целью настоящей работы было сравнительное исследование поглощения и субклеточного распределения пустых липосом и липосом с α -токоферолом в печени крыс в норме и при хронической печеночной недостаточности, вызванной венозным застоем.

Материалы и методы исследования

Моделирование хронической печеночной недостаточности

Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 300-330 г в соответствии с принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Животным под эфирным наркозом в асептических условиях вскрывали брюшную полость. Хроническую печеночную недостаточность моделировали путем перевязки правой и центральной печеночных вен дистальнее места впадения их в нижнюю полую вену. Лигирование вен осуществляли постепенно, в течение 2-3 мин. В результате венозного застоя за 8 недель у экспериментальных животных развивалась хроническая печеночная недостаточность (ХПН). Наличие печеночной недостаточности контролировали по морфологической сохранности органа и активности в крови ферментов-маркеров состояния печени (лактатдегидрогеназа, сорбитолдегидрогеназа, аргиназы и γ -глутамилтрансферазы) [1].

В экспериментах использовали два вида липосом – пустые липосомы (ПЛ) и липосомы с α -токоферолом (ТФЛ).

Приготовление меченых липосом

Липосомы готовили из мультиламеллярных везикул методом экструзии через поликарбонатные фильтры на экструдере фирмы Lipex Biomembranes Inc. (Канада). Перед экструзией при помощи ротационного испарителя Heidolph (Германия) на стенках стеклянной колбы объемом 0,5 л получали липидную пленку, состоящую из яичного лецитина (Lipoid, Германия) и холестерина (Sigma) в молярном соотношении 7 : 5 для ПЛ. При изготовлении ТФЛ на этапе получения липидной пленки в колбу испарителя добавляли α -токоферол. Молярное соотношение лецитин : холестерин : α -токоферол для ТФЛ составляло 7 : 3 : 1, соответственно. Радиоактивную «метку» вводили в виде ^3H -фосфотидилхолина на этапе получения липидной пленки из расчета 1333,3 мкКю/г липида.

Полученную липидную пленку гидратировали 0,9%-ным раствором NaCl и встряхивали до образования мультиламеллярных везикул. Образовавшуюся суспензию 10-кратно пропускали через экструдер с использованием поликарбонатных фильтров («Costar») с размером пор 100 нм. Содержание липидов в полученном препарате составляло 25 мг/мл.

Введение меченых липосом и определение радиоактивности

Меченые липосомы вводили крысам через хвостовую вену в объеме 0,3 мл на животное, суммарная радиоактивность введенного препарата составляла 10 мкКю. Было сформировано 4 группы животных: 1 – интактные животные с введением ПЛ, 2 – интактные животные с введением ТФЛ, 3 – животные с моделированной ХПН и введением ПЛ, 4 – животные с моделированной ХПН и введением ТФЛ. Для каждой группы использовали 12 животных. Через 1, 2, 4, 12, 24, 48 ч после инъекции липосомальных препаратов животных выводили из эксперимента и извлекали печень с последующим взвешиванием. Пробы печени гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе со стеклянным поршнем в 0,9%-ном растворе хлорида натрия (4 мл раствора на 1 г массы ткани печени). Часть гомогената использовали для определения общей активности метки ткани. Для этого к 0,2 мл гомогената добавляли

хлороформ-метанол и определяли радиоактивность пробы по методике, описанной ниже. По полученным данным определяли процентное содержание липидной метки в пересчете на общую массу печени.

Другую часть гомогената использовали для получения субклеточных фракций. Для этого 1 мл гомогената центрифугировали (при 3000 g в течение 30 мин, при 10000 g – 30 мин и при 100000 g – 40 мин), последовательно выделяя фракции грубого осадка, митохондриальную и микросомальную [3]. Фракцию грубого осадка, содержащую ядра и «осколки» клеток, в дальнейших исследованиях не использовали.

Осадки после второго и третьего центрифугирования ресуспендировали в 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида.

Затем к аликвоте 0,2 мл суспензий осадков и супернатанта последнего центрифугирования добавляли 0,4 мл метанола и 0,2 мл хлороформа. Смесь интенсивно перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре и добавляли 0,2 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и 0,4 мл хлороформа. После разделения путем центрифугирования при 10000 g в течение 1 мин хлороформенной и водной фаз отбирали 0,1 мл хлороформенной фазы для определения радиоактивности. Активность аликвот просчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике RackBeta (LKB, Швеция) в 5 мл стандартного толуолового сцинтиллятора. После первичного считывания для оценки гашения сцинтилляции в растворе в каждый флакон вносили аликвоту (10 мкл) раствора ³H-лецитина в хлороформе с известной активностью трития (около 100000 cpm), и флаконы вторично просчитывали.

Активность трития в каждом образце рассчитывали по формуле:

$$I = I_1 / (I_0/I_2 - I_1),$$

где I_1 – скорость счета образца при первом считывании (cpm), I_2 – скорость счета образца при втором считывании (cpm), I_0 – скорость счета добавленной аликвоты лецитина (cpm).

В каждой пробе активность трития во фракциях митохондрий, микросом и супернатанта суммировали и принимали за 100%. Затем рассчитывали процентное содержание меченого лецитина в каждой фракции.

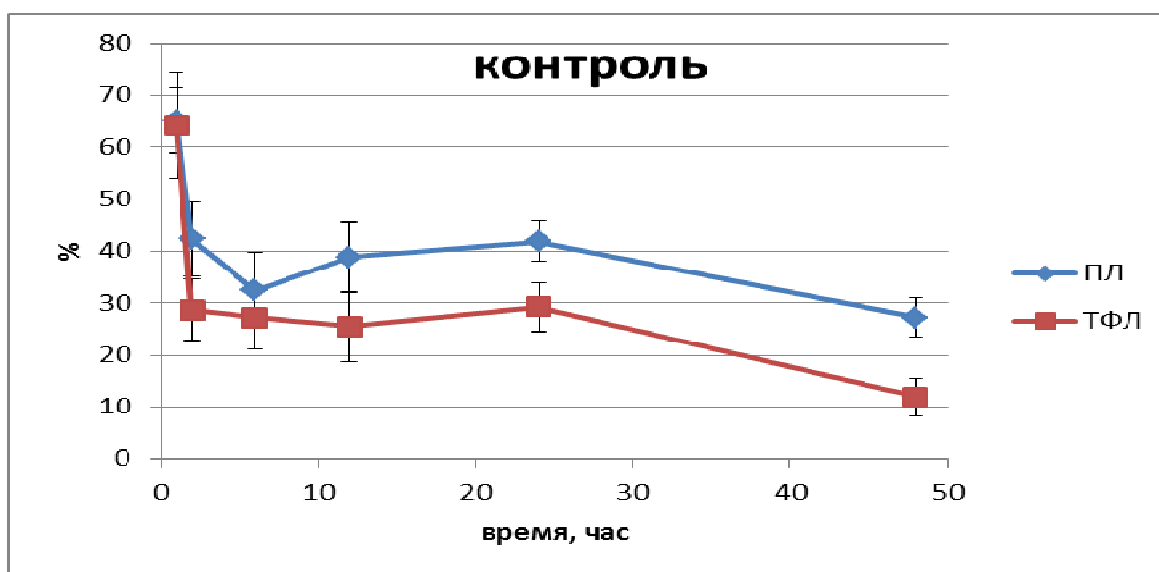
Радиоактивность проб измеряли в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 7.0. Производили предварительную проверку выборок на нормальность распределения с использованием критерия χ^2 . Рассчитывали значение средней арифметической величины и стандартной ошибки. Для оценки достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании включения липосом и перераспределения радиоактивной метки, введённой в составе ПЛ и ТФЛ, в печени интактных животных была обнаружена в целом сходная динамика изменения активности метки в тканях, имеющая, однако, количественные различия. Эти различия могут быть связаны с изменением свойств мембраны липосом при введении в их состав α -токоферола.

Так, через 1 ч после введения как ПЛ, так и ТФЛ, до 70% введенной метки регистрировали в печени. Через 2 ч 33% поглощенной метки ПЛ и 54% поглощенной метки ТФЛ покидали орган (рис. 1А). Это может быть связано с метаболизмом и утилизацией липосом печеночной тканью. Затем, в случае введения ТФЛ, в течение первых суток количество метки сохранялось приблизительно на одном уровне. В случае же введения ПЛ к окончанию первых суток наблюдали возрастание активности метки в печени, что может свидетельствовать о повторном захвате из кровотока экскретированной метки клетками печени. Так как в захвате и переносе липидов кровью важную роль играют липопротеиды, можно предполагать, что после выхода ^3H -лецитина в кровоток часть его захватывалась липопротеидами, а затем, уже в составе последних, метка вновь попадала в клетки печени. Именно такой цикл миграции липосомального липида был доказан в экспериментах Scherphof et. al. [11]. Другой гипотетический механизм повторного поглощения метки клетками печени может быть реализован путем экскреции с желчью и последующей реабсорбции из желудочно-кишечного тракта. К концу вторых суток в обеих группах количество метки в печени заметно снижалось, что можно объяснить выведением продуктов катаболизма липосом. Следует отметить, что концентрация метки при введении ТФЛ была несколько ниже на протяжении всего периода наблюдения.



А

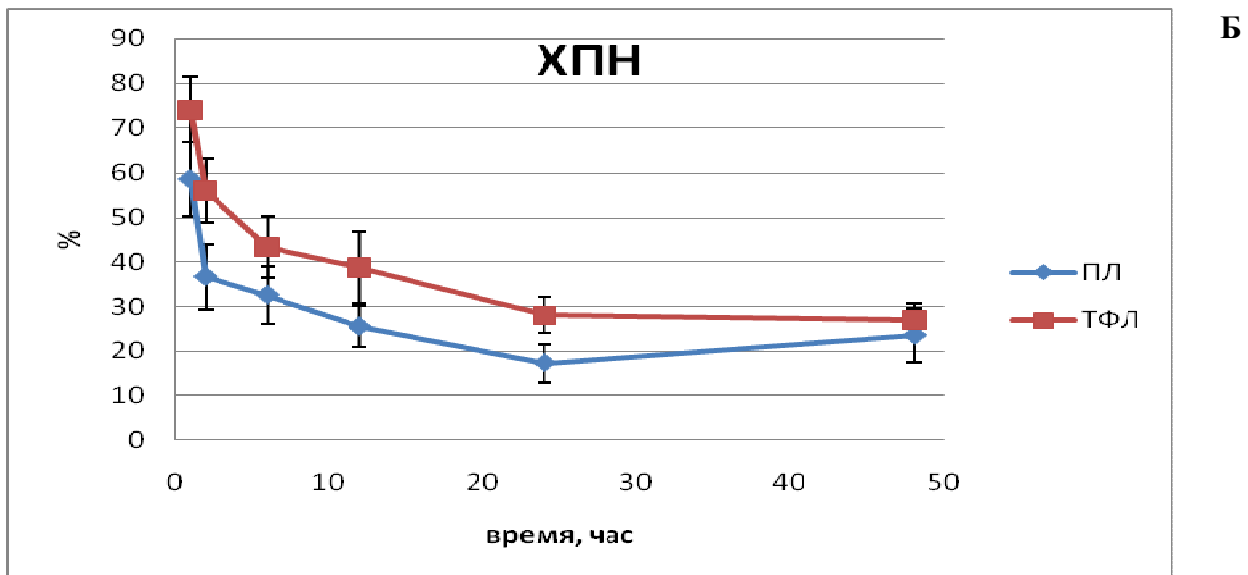


Рис. 1. Кинетика изменения активности ³Н-лецитина, введенного в составе ПЛ и ТФЛ, в печени интактных крыс (А) и крыс с ХПН (Б).

При введении ПЛ и ТФЛ животным с ХПН также происходило поглощение меченых липосом тканями печени. Это доказывает, что при ХПН застойного генеза печень сохраняет способность к поглощению липосом. Однако динамические характеристики процесса поглощения отличались от таковых у интактных животных. У животных с ХПН в течение 1 ч после введения ТЛФ в печени накапливалось до 80% метки и лишь 60% – при введении ПЛ (рис. 1Б). Концентрация метки в печеночной ткани в обеих группах выравнивалась лишь к 2 суткам после введения. В течение этого периода наблюдали постепенное снижение активности метки. Повторного захвата метки у животных с ХПН не отмечали. Следует подчеркнуть, что в течение первых 6 часов снижение активности метки липосом у животных с ХПН происходило медленнее по сравнению с интактными. По-видимому, это связано с общим снижением активности обменных процессов при данной печеночной патологии. В период до 24 ч отмечена тенденция повышенного поглощения ТФЛ относительно ПЛ «застойной» печени. Можно предполагать, что более активный захват ТФЛ застойной печенью обусловлен активным включением α -токоферола в процессы «гашения» свободно-радикального окисления липидов гепатоцитарных мембран.

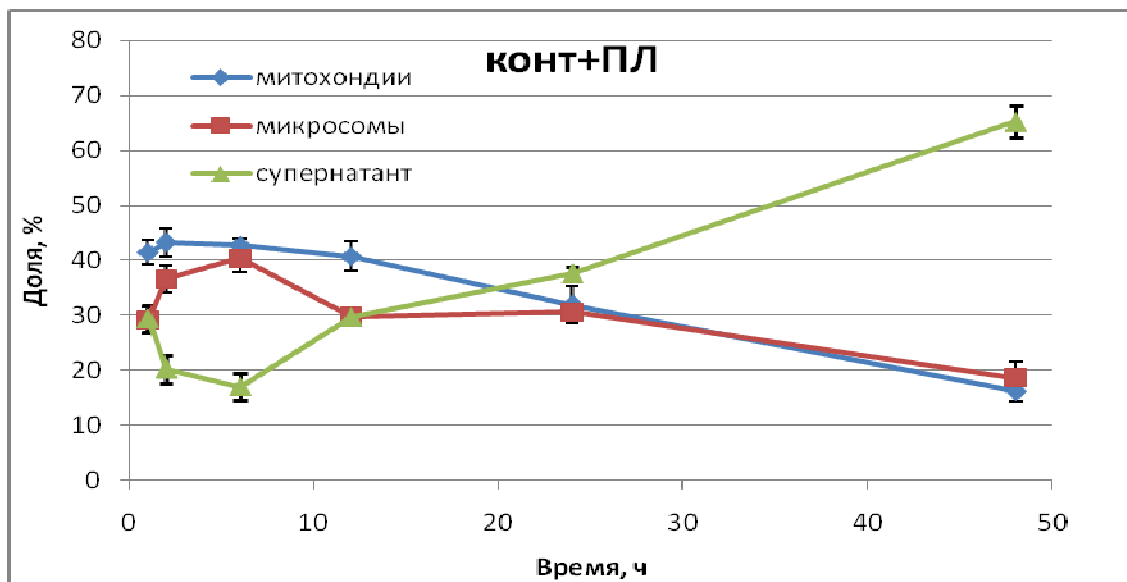
Сравнительное изучение кинетики субклеточного распределения ³Н-фосфатидилхолина ПЛ и ТФЛ в гепатоцитах интактных крыс и крыс с ХПН (рис. 2) показало, что у контрольных животных через 1 час после введения ПЛ в митохондриях находилось свыше 40%, в микросомах и супернатанте – около 30% введенной метки. В период с 2 до 6 ч относительное содержание метки в митохондриях оставалось постоянным при одновременном повышении ее содержания в микросомах за счет снижения в супернатанте. В период с 12 до 48 ч отмечено

постепенное увеличение содержания метки в супернатанте и снижение – в митохондриях и микросомах.

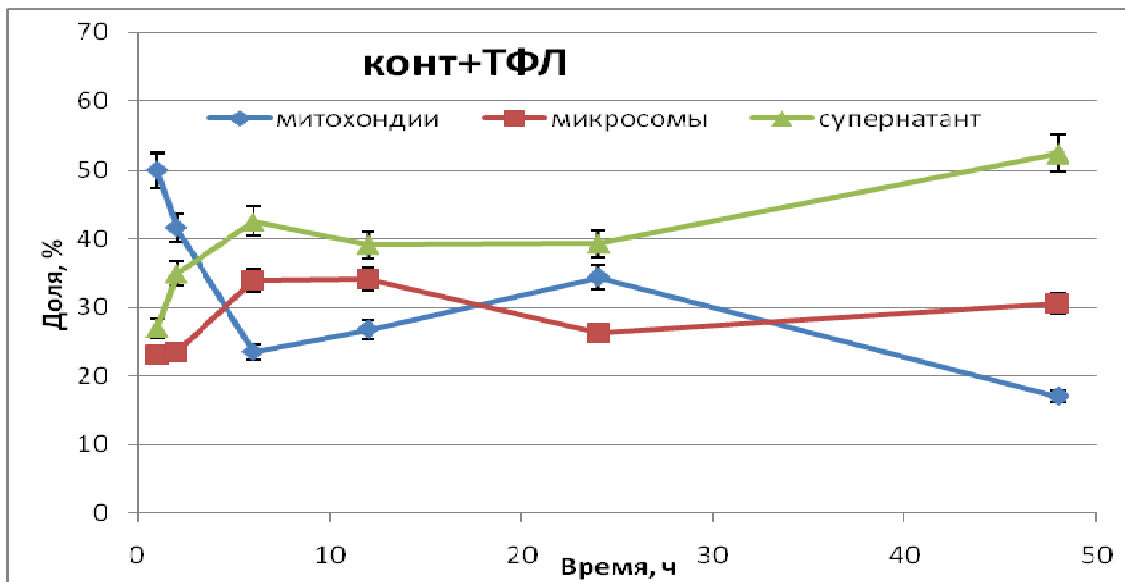
В то же время при использовании ТФЛ содержание метки в митохондриальной фракции приближалось к 50% через 1 ч после введения. Содержание метки в микросомах и супернатанте составляло около 25%. Затем в период до 6 ч происходило практически линейное снижение активности метки в митохондриях при одновременном увеличении ее активности в микросомальной фракции и супернатанте. В дальнейшем в период от 6 до 48 ч концентрация метки в микросомальной фракции сохранялась на уровне около 30%, а в митохондриях и супернатанте наблюдали разнонаправленные изменения.

Таким образом, у интактных животных пустые липосомы более равномерно распределяются по субклеточным фракциям и быстрее выводятся в супернатант, чем антиоксидантные. При этом микросомальные структуры более стабильно, нежели митохондриальные, удерживают ТФЛ.

У животных с застойной ХПН (рис. 3) через 1 ч после введения ПЛ наблюдали равномерное распределение липосомальной метки между фракциями. Через 6 ч отмечено перераспределение метки в митохондриальную фракцию и убывание ее в супернатанте. Через 24 и 48 ч соотношение содержания метки между фракциями практически выравнивалось и колебалось в диапазоне 30-36%.



А

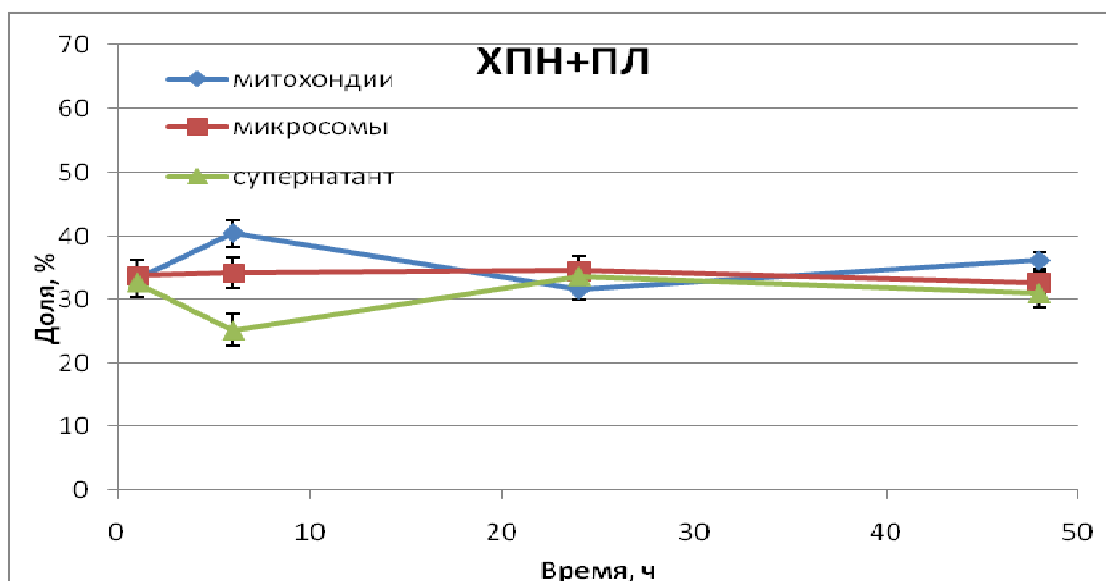


Б

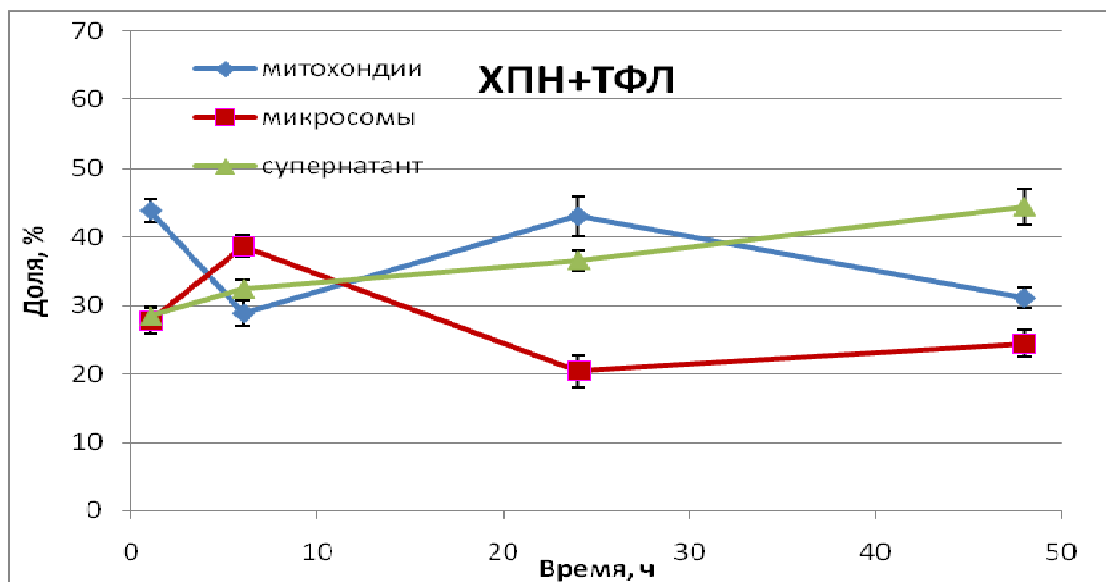
Рис. 2. Кинетика субклеточного распределения ^3H -лецитина, введенного в составе ПЛ (А) и ТФЛ (Б) в гепатоцитах интактных крыс.

Можно предполагать, что равномерное распределение метки между фракциями связано со снижением активности биохимических процессов при ХПН.

Через 1 ч после введения ТФЛ животным с ХПН более 40% метки появлялось во фракции митохондрий и около 30% – во фракциях микросом и супернатанте. К 6 ч содержание метки в митохондриях снижалось, а к 24 ч вновь возрастало. Особенностью этой группы было возрастание содержания метки во фракции супернатанта при разнонаправленных колебаниях ее относительного содержания во фракциях митохондрий и микросом. Преимущественное накопление метки в митохондриях, аналогичное наблюдавшемуся в группе интактных животных, может быть вызвано репаративным эффектом α -токоферола по отношению к ишемизированным клеткам.



А



Б

Рис. 3. Кинетика субклеточного распределения ^3H -лецитина, введенного в составе ПЛ (А) и ТФЛ (Б) в гепатоцитах крыс с моделированной ХПН.

Следует отметить, что включение в состав мембраны α -токоферола влияет как на поглощение липосом клетками, так и на внутриклеточное их распределение. Поскольку композиция липосомальной мембраны во многом определяет характер взаимодействия липосом с клетками [6; 7], можно предполагать, что наличие α -токоферола в липидной фазе мембраны изменяет ее физико-химические характеристики и, как следствие, параметры поглощения и распределения липосом.

Заслуживает внимания факт увеличения тропности ТЛФ по отношению к митохондриям, отмеченный в данном исследовании. Известно, что различные поражения печени сопровождаются дисфункциями митохондрий [4; 6; 9; 10]. Митохондриальные дисфункции приводят к генерации активных форм кислорода и неконтролируемой активации свободно-радикального окисления, результирующего в клеточные деструкции. По-видимому, полученные ранее данные, демонстрирующие высокую терапевтическую эффективность липосомальных композиций с антиоксидантами при «застойной» печени [2; 8], связаны с инактивацией активного кислорода, образовавшегося в митохондриях.

Суммируя полученные результаты, допустимо заключить, что липосомальные композиции могут быть использованы для доставки БАВ в клетки как в норме, так и при заболеваниях печени, так как, несмотря на различные количественные и качественные характеристики поглощения, сам факт включения и внутриклеточной утилизации липосом не вызывает сомнений. В целом способность липосом проникать внутрь гепатоцитов позволит создать на их основе композиции, обладающие тропностью к определенным клеточным

органеллам, и может служить основой для разработки высокоэффективных фармацевтических препаратов для внутриклеточной терапии.

Список литературы

1. Воронцова Н.Л., Мухамадияров Р.А., Журавлева И.Ю. Моделирование застойной печеночной недостаточности в эксперименте на крысах // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – № 2. – Вып. 1. – С. 98-99.
2. Мухамадияров Р.А. [и др.] Сравнительная оценка эффективности липосомальных препаратов при экспериментальной хронической печеночной недостаточности, вызванной венозным застоем // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 4. – С. 130-135.
3. Эванз У.Г. Органеллы и мембраны животной клетки // Биологические мембраны. Методы / под ред. Финдлея Дж. Б., Эванза У. Г. – М. : Мир, 1990. – С. 13-61
4. Boddapati S.V., Tongcharoensirikul P., Hanson R.N., D'Souza G.G.M., Torchilin V.P., Weissig V. Mitochondriotropic liposomes // Journal of Liposome Research. – 2005. – Vol. 15. – № 1-2. – P. 49-58.
5. Boddapati S.V., D'Souza G.G.M., Erdogan S., Torchilin V.P., Weissig V. Organelle-targeted nanocarriers: specific delivery of liposomal ceramide to mitochondria enhances its cytotoxicity in vitro and in vivo // Nano Lett. – 2008. – V. 8. – №. 8. – P. 2559-2563.
6. Ishida T., Harashima H., Kiwada H. Liposome Clearance // Bioscience Reports. – 2002. – V. 22. – № 2. – P. 197-224.
7. Kamp J.A., Morselt H.W., Swart P.J., Mojer D.K., Shero G.L. Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumin to hepatic endothelial cell. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – No 21. – P. 11681-11685.
8. Mukhamadiyarov R.A., Vorontsova N.L. Use of liposomes for experimental chronic liver insufficiency therapy // Journal of international scientific publications: Materials, methods, technologies. – 2011. – V. 5, part 2. – P. 43-51.
9. Pollock S., Antrobus R., Newton L., Kampa B., Rossa J., Latham S., Nichita N. B., Dwek R.A., Zitzmann N. Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum // The FASEB Journal. – 2010. – V. 24. – № 6. – P. 1866-1878.
10. Sastre J., Serviddio G., Pereda J., Minana J.B., Arduini A., Vendemiale G., Poli G., Pallardo F.V., Vina J. Mitochondrial function in liver disease // Frontiers of bioscience: a journal and library. – 2007. – V. 12. – № 1. – P. 1200-1209.
11. Shero G.L., Kamps J.A. The role of hepatocytes in the clearance of liposomes from the blood circulations // Prog. Lipid. Res. – 2001. – V. 40. – № 3. – P. 149-166.

12. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2005. – № 4. – P. 145-160.

13. Zhang L., Gu F.X., Chan J.M., Wang A.Z., Langer R.S., Farokhzad O.C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments // *Clinical pharmacology & therapeutics*. – 2008. – V. 83. – № 5. – P. 761-769.

Рецензенты:

Подолужный Валерий Иванович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии, ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», г. Кемерово.

Разумов Александр Сергеевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии, ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия», г. Кемерово.