

УДК 577.352.24:615.1

ВЛИЯНИЕ А-ТОКОФЕРОЛА НА ДИНАМИКУ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ЛИПОСОМАХ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДАМИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ СОНИФИКАЦИИ И ЭКСТРУЗИИ, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ ХРАНЕНИЯ

Мухамадияров Р.А., Веремеев А.В., Марцияш Н.Е., Зинчук В.Г.

*НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН,
Кемерово, e-mail: rem57@rambler.ru*

В настоящее время одним из перспективных способов внутриклеточного направленного транспорта лекарственных средств является использование везикулярных наносистем – липосом. Однако до сих пор не решены вопросы стандартизации – липосомальной композиции и возможности ее длительного хранения. В настоящей работе использовали липосомы, приготовленные методами ультразвуковой сонификации и экструзии. Хранили полученные везикулы при 250 и 40 °С. Оценивали накопление малонового диальдегида, диеновых и триеновых конъюгатов. Для везикул, полученных как методом экструзии, так и ультразвуковой сонификацией, повышение температуры хранения до 250 °С способствует активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), что проявляется в накоплении продуктов липопероксидации. Везикулы, приготовленные методом экструзии, являются более стабильными к действию ПОЛ. Введение в состав липосомальной мембраны α -токоферола снижает образование диеновых, триеновых конъюгатов и малонового диальдегида. Таким образом, липосомы, приготовленные методом экструзии, в состав мембраны которых дополнительно введен α -токоферол, могут быть использованы как эффективная и безопасная лекарственная форма.

Ключевые слова: липосомы, перекисное окисление липидов, α -токоферол

THE A-TOCOPHEROL INFLUENCE TO THE LIPOPEROXIDATION PROCESS IN THE LIPOSOMES (IN DIFFERENT STORAGE TEMPERATURES) PRODUCED USING ULTRASONIC SONIFICATION AND EXTRUSION METHODS

Mukhamadiarov R.A., Veremeev A.V., Martsiyash N.Y., Zinchuk V.G.

Scientific research institute of complex problems of cardiovascular diseases FROM the Russian Academy of Medical Science, Kemerovo, e-mail: rem57@rambler.ru

Currently one of the promising approaches to intracellular drug-delivery is application of such vesicular nanosystems, like liposomes. However, the issues of liposomal composition standardization and possibility of its long-term storage have not yet been resolved. Abstract: Study of the change of concentration level products lipoperoxidation in liposomes depending on structure, a way of reception and temperature storage. The liposomes were stored at 40 or 250 °C. Diene- and triene- conjugate and malondialdehyde (MDA) content was determined. For liposomes produced by both extrusion and ultrasonic sonification methods, the increase in storage temperature to 250 °C contributes to the activation of lipoperoxidation. The liposomes produced by the extrusion method are more resistant against peroxidation. Introduction of α -TF in the membrane composition results in decrease in concentration of diene- and triene- conjugate and MDA. Thus liposomes with α -TF in the membrane composition prepared by extrusion can be used as a effective and safe medicinal form.

Keywords: liposomes, lipid peroxidation, α -tocopherol

Наиболее распространенным и перспективным направлением использования везикулярных мембранных систем в биологии и медицине является создание липосомальных форм лекарственных препаратов [6, 7]. Однако широкому их применению препятствуют проблемы изменения физико-химических свойств мембран липосом при воздействии внешних факторов, таких как температура и время хранения, способ получения липосом. Очевидно, что одной из основных причин повреждения липосомальной мембраны является активация перекисного окисления липидов [8]. И поскольку наличие продуктов липопероксидации является определяющим в развитии повреждения мембраны и оказывает существенное влияние на их структуру и биологические свойства, то закономерно

возникает вопрос о необходимости их стандартизации по содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и целесообразности включения антиоксидантных факторов в липидную фазу липосом.

В настоящем исследовании изучали влияние α -токоферола, включенного в липидную фазу, на динамику процессов липопероксидации в мембранах липосом, полученных методами экструзии и ультразвуковой сонификации, хранившихся при температуре 4 и 25 °С.

Материалы и методы исследования

Для приготовления липосом использовали фосфатидилхолин и холестерин в молярном соотношении 7:5 соответственно («стандартные» липосомы). В качестве антиоксидантного фактора использовали α -токоферол. Для приготовления липосом с α -токоферолом (« α -ТФ» липосомы) соотношение

фосфатидилхолин: холестерин: α-токоферол составило 6:3:1. Липосомы готовили методом экструзии («экструдерные липосомы») и методом ультразвуковой сонификации («ультразвуковые липосомы»). Весь материал разделили на четыре группы (табл. 1): «стандартные» экструдерные липосомы (I группа); «стандартные» ультразвуковые липосомы (II группа); «α-ТФ» экструдерные липосомы (III группа); «α-ТФ» ультразвуковые липосомы (IV группа). Хранили липосомы при температуре 4 и 25 °С. В каждой группе определяли содержание диеновых и триеновых конъюгатов, малонового диальдегида. Детекцию продуктов ПОЛ проводили через 3, 24, 48 и 72 часа.

Таблица 1
Дизайн эксперимента и обозначение групп

Способ получения липосом	Тип липосом			
	«стандартные липосомы»		«α-ТФ липосомы»	
	температура хранения			
	4 °С	25 °С	4 °С	25 °С
Экструзия	I ₄ n = 20	I ₂₅ n = 20	III ₄ n = 20	III ₂₅ n = 20
УЗС	II ₄ n = 20	II ₂₅ n = 20	IV ₄ n = 20	IV ₂₅ n = 20

Получение мультиламеллярных везикул

В колбу ротационного испарителя ИР-1М2 помещали раствор липидов, приготовленный на перегнанном хлороформе. Раствор упаривали в вакууме при температуре 55 °С. После чего заливали буферный раствор (0,1 М трис-НСl, рН 7,4) либо раствор, содержащий соответствующее действующее вещество. Колбу интенсивно встряхивали в присутствии стеклянных шариков.

Получение малых однослойных липосом методом ультразвуковой сонификации

Озвучивание проводили с использованием ультразвукового дезинтегратора («type UD-20», ТЕСНАН, Польша). Суспензию мультиламеллярных везикул помещали в толстостенный стеклянный стакан. Наконечник излучателя погружали непосредственно в суспензию и проводили «озвучивание» в течение 4–5 мин. Осаждали сохранившиеся мультиламеллярные везикулы методом центрифугирования в рефрижераторной центрифуге 10000 g в течение 15 мин. Размер липосом контролировали по спектру мутности [4].

Получение малых однослойных липосом методом экструзии

Перед экструзией для достижения максимального включения действующих веществ вводили дополнительную стадию гидратации липидов методом 5-кратного замораживания-оттаивания, рекомендуемую разработчиками метода [5]. Экструзию проводили 10-кратно через полкарбонатные фильтры Costar с размером пор 0,1 мкм (экструдер Lipex Biomembranes Inc., Канада).

Метод определения малонового диальдегида (МДА)

МДА определяли стандартным методом [2] с помощью α-тиобарбитуровой кислоты (ТБК). В пробирки к смеси 1,5 мл 2% H₃PO₄ и 0,5 мл 0,8% ТБК добавляли 0,05 мл раствора липосом и 45 мин кипятили

на водяной бане, охлаждали. В контрольный образец вместо липосом добавляли дистиллированную воду. Смесь экстрагировали в 2 мл бутанола и центрифугировали 10 мин. Экстракт фотометрировали при длине волны 535 нм в кюветках с оптическим путем 10 мм. Активность вычисляли по формуле:

$$A = D_{\text{оп}} \cdot 4/1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,05 \cdot 25 \text{ ммоль/мг липида.}$$

Определение диеновых (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК)

Для оценки содержания диеновых и триеновых конъюгатов использовали индекс Клейна (Klein). По этому методу ДК и ТК оцениваются по соотношениям оптической плотности D₂₃₃/D₂₁₅ и D₂₆₈/D₂₁₅ соответственно. Для этого 20 мкл препарата разбавляли в 2 мл этанола. Фотометрировали при длинах волн 215, 238 и 268 нм против этанола.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для описания признаков с отличным от нормального распределением указывали медиану и межквартильный размах – 25-й и 75-й процентиля. В качестве критерия сравнения выбирали дисперсионный анализ (ANOVA) для зависимых и независимых выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что исходный уровень и дальнейшая динамика накопления продуктов ПОЛ в липосомах зависят, как минимум, от трех факторов: липидного состава мембраны, способа получения и температуры хранения препарата. Безусловно, это не исключает потенциального наличия других факторов, влияющих на данные показатели [1].

Так, влияние способа получения липосом на показатели ПОЛ было отчетливо продемонстрировано при изучении динамики накопления вторичного продукта оксидации – МДА. Исходная концентрация МДА в группах липосом, полученных методом ультразвуковой сонификации (II₄ и II₂₅), почти в 3 раза превышала данный показатель в «экструдерных» липосомах (I₄ и I₂₅) (рис. 1).

Отмечена прямая зависимость накопления МДА от температуры хранения липосомальных препаратов. Так, на протяжении всего периода наблюдения происходило значительное нарастание концентрации МДА в липосомах II₂₅ и I₂₅ групп в 1,3 и 2,9 раза (p < 0,05) соответственно. В то же время содержание данного продукта к 72 часу в группах I₄ и II₄ достоверно (p > 0,05) не отличалось от исходных показателей. Кроме того, в группе II₄ имело место достоверное (p < 0,05) снижение концентрации МДА на первые и вторые сутки наблюдения.

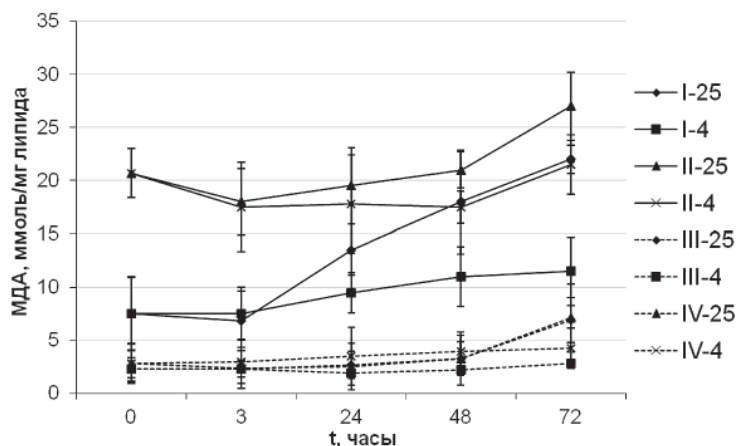


Рис. 1. Динамика накопления малонового диальдегида в липосомах различного состава и полученных различными методами

Введение в состав липосомальной мембраны α -токоферола снижало накопление МДА вне зависимости от способа получения липосом. Так, исходные значения содержания МДА в группах III₄, III₂₅ и IV₄, IV₂₅ были в 2,5–9 раз ниже ($p < 0,05$), чем в I₄, I₂₅ и II₄, II₂₅ группах соответственно. Известно, что α -токоферол является ловушкой электронов и свободных радикалов, следовательно он работает как антиоксидант преимущественно на начальных стадиях процесса окисления липидов [3]. Поэтому можно предполагать, что, будучи в составе липосом, α -токоферол исключает негативное влияние свободных форм кислорода и других возможных прооксидантных факторов, сопровождающих процесс получения липосомальных препаратов.

Необходимо также отметить, что внутри блока « α -ТФ липосом» достоверных различий между группами не наблюдали ($p > 0,05$) вплоть до 48 часа наблюдения. В дальнейшем отмечали резкое увеличение концентрации МДА в группах III₂₅ и IV₂₅ – в 2,8 раза для обеих групп по сравнению с исходными величинами ($p < 0,05$), что, ве-

роятно, обусловлено температурозависимой интенсификацией процессов ПОЛ и связанным с ней расходом пула α -токоферола.

В группах α -ТФ липосом, хранившихся при 4 °С (III₄ и IV₄) концентрация МДА на всем протяжении эксперимента достоверно ($p > 0,05$) не отличалась от исходных показателей.

Несколько иная динамика была отмечена для другого вторичного продукта ПОЛ – триеновых конъюгатов (рис. 2). Исходная концентрация данного метаболита в липосомах II_{4,25} групп (УЗС липосомы) была достоверно ($p < 0,05$) выше в 1,4 раза по сравнению с показателями I_{4,25} групп (экструдерные липосомы). Максимальный уровень ТК был отмечен во II₂₅ и I₂₅ группах к третьим суткам наблюдения. Эти показатели более чем в 2 раза превышали исходный уровень ($p < 0,05$). Низкий уровень ТК наблюдали в I₄ и II₄ группах, где конечная концентрация превышала исходные значения лишь в 1,6 и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно. В связи с этим можно сделать вывод о преимущественно термозависимом механизме накопления ТК в «стандартных» липосомах.

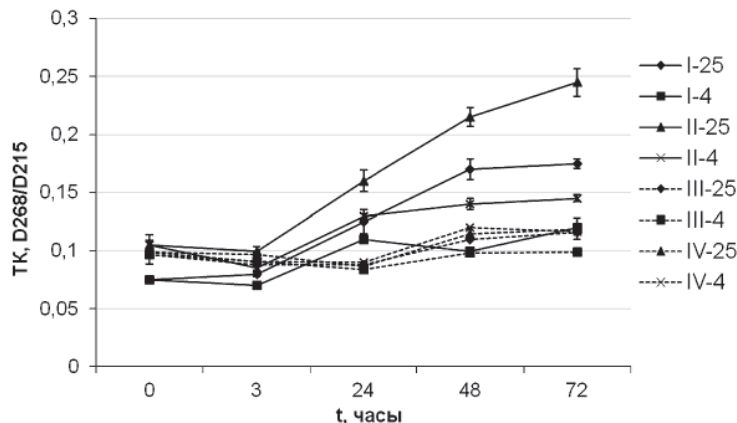


Рис. 2. Динамика накопления триеновых конъюгатов в липосомах различного состава и полученных различными методами

Для липосом, в состав которых включали α -токоферол, наблюдали следующие закономерности: исходная концентрация ТК практически не зависела от способа приготовления и температуры хранения. Кроме того, до 24 часов наблюдали недостоверную тенденцию к снижению уровня данного показателя во всех группах эксперимента. Только ко вторым суткам в группах III_{4,25}, IV₄ и IV₂₅ наблюдали достоверное ($p < 0,05$) нарастание концентрации ТК в 1,2 раза с дальнейшим выходом на плато, вплоть до 72 часов. В группе III₄ уровень данного метаболита к этому периоду достоверно не отличался ($p > 0,05$) от исходных показателей.

Важно отметить, что присутствие α -токоферола в мембране липосом предотвращало накопление ТК в течение всего периода исследования, о чем свидетельствуют достоверно ($p < 0,05$) меньшие в 0,5–2,5 раза значения в группах III_{4,25} и IV_{4,25} относительно показателей в группах I_{4,25} и II_{4,25}.

Способностью α -токоферола гасить свободные радикалы можно объяснить и закономерности, полученные при изучении динамики накопления диеновых конъюгатов.

Так, исходный уровень ДК в «стандартных» липосомах был несколько выше, чем в « α -ТФ липосомах» (рис. 3).

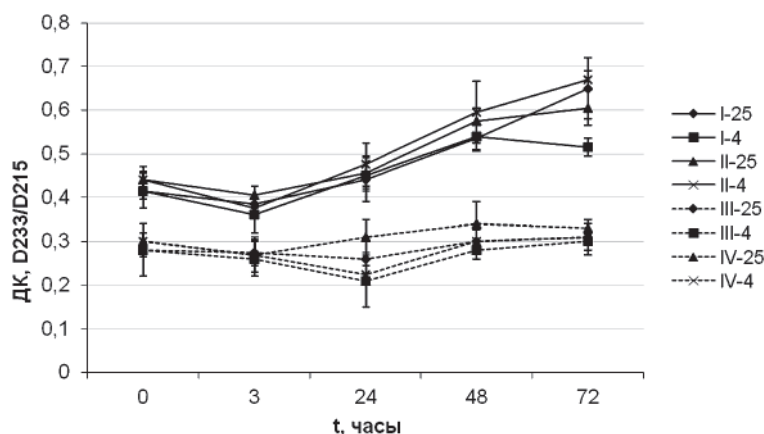


Рис. 3. Динамика накопления диеновых конъюгатов в липосомах различного состава и полученных различными методами

Ко вторым суткам концентрация ДК в «стандартных» липосомах достоверно ($p < 0,05$) возрастала по сравнению с исходной, и эта тенденция сохранялась до третьих суток.

В то же время в « α -ТФ» липосомах достоверное увеличение уровня ДК было отмечено лишь в IV₂₅ группе, причем процесс нарастания ДК начался уже в первые сутки. В других группах достоверного увеличения ДК отмечено не было, более того, в липосомах, хранившихся при 4 °С, вне зависимости от способа получения, в первые сутки было выявлено достоверное ($p < 0,05$) уменьшение концентрации ДК.

Заключение

Таким образом, для липосом, полученных как методом экструзии, так и ультразвуковой сонификации, повышение температуры хранения до 25 °С способствует активации процессов ПОЛ, что проявляется в накоплении диеновых и триеновых конъюгатов, а также МДА. Липосомы, приготовленные методом экструзии, являются более резистентными к действию прооксидантных факторов. Введение в состав ли-

посом α -токоферола стабилизирует липосомальную мембрану к воздействию ПОЛ, что проявляется значительно более низкими концентрациями маркеров ПОЛ на протяжении всего периода наблюдения.

Список литературы

1. Безрукова А.Г., Розенберг О.А. Определение параметров липосом методом спектра мутности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1981. – № 91.4. – С. 506–508.
2. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под. ред. В.Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 66–68.
3. Fukuzawa K. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant of alpha-tocopherol in membranes // Journal of nutritional science and vitaminology. – 2008. – № 54(4). – P. 273–285.
4. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis // The Journal of nutritional biochemistry. – 2008. – № 19(8). – P. 491–504.
5. Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes // Chemistry and Physics of Lipids. – 1986. – № 40. – P. 333–345.
6. Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, Singh KP. Preparation, characterization and in vitro realize study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes // International journal of nanomedicine. – 2010. – № 5. – P. 101–108.

7. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Aditha C. Novel applications of nanotechnology in medicine // The Indian journal of medical research. – 2009. – № 130(6). – P. 689–701.

8. Tang L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxyl radical // The Biochemical journal. – 2000. – № 352. – P. 27–36.

References

1. Bezrukova A.G., Rozenberg O.A. Opredelenie parametrov liposom metodom spektra mutnosti // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 1981. no. 91.4. pp. 506–508.

2. Stal'naja I.D. Metod opredelenija malonovogo dial'degida s pomow'ju tiobarbiturovoj kisloty // Sovremennye metody v biohimii / pod.red. V.N. Orehovicha. M.: 1977. pp. 66–68.

3. Fukuzawa K. Dynamics of lipid peroxidation and antioxidant of alpha-tocopherol in membranes // Journal of nutritional science and vitaminology. 2008. no. 54(4). pp. 273–285.

4. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis // The Journal of nutritional biochemistry. 2008. no. 19(8). pp. 491–504.

5. Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes // Chemistry and Physics of Lipids. 1986. no. 40. pp. 333–345.

6. Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, Singh KP. Preparation, characterization and in vitro realize study of albendazol-encapsulated nanosize liposomes // International journal of nanomedicine. 2010. no. 5. pp. 101–108.

7. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Aditha C. Novel applications of nanotechnology in medicine // The Indian journal of medical research. 2009. no. 130(6). pp. 689–701.

8. Tang L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The mechanism of Fe²⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxyl radical // The Biochemical journal. 2000. no. 352. P. 27–36.

Рецензенты:

Плотников М.Б., д.б.н., руководитель лаборатории фармакологии кровообращения ФБГУ «Научно-исследовательский институт фармакологии» СО РАМН, г. Томск;

Григорьев Е.В., д.м.н., заместитель директора по научной и лечебной работе, ведущий лабораторией критических состояний ФБГУ «Научно-исследовательский институт проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 09.04.2012.