

Сравнительная оценка эффективности липосомальных препаратов при экспериментальной хронической печеночной недостаточности, вызванной венозным застоем

Мухамадияров Р.А., Воронцова Н.Л., Борисов В.В., Кудрявцева Ю.А., Журавлёва И.Ю.

Comparative assessment of hepatoprotective effects of various liposome formulations in experimental venous congestion-induced chronic liver insufficiency

Mukhamadiyarov R.A., Vorontsova N.L., Borisov V.V., Kudryavtseva Yu.A., Juravleva I.Yu.

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово

© Мухамадияров Р.А., Воронцова Н.Л., Борисов В.В. и др.

Проведена оценка эффективности применения лецитин-холестериновых липосом для коррекции хронической печеночной недостаточности, обусловленной венозным застоем у крыс. Изучался эффект «пустых» липосом, липосом, содержащих аденозинтрифосфат и креатинфосфат, и липосом, содержащих α -токоферол, супероксиддисмутазу и восстановленный глутатион. Исследованные липосомальные препараты оказывали гепатопротекторный эффект, что проявлялось в снижении в крови активности ферментов — маркеров цитолиза и уровня окислительного стресса. На гистологическом уровне эффект проявлялся в частичном восстановлении балочной структуры и уменьшении количества очагов некротизации.

Ключевые слова: печеночная недостаточность, липосомы, перекисное окисление липидов.

The aim of the study was to evaluate the efficacy of lecithin/cholesterol liposomes in the therapy of experimental venous congestion-induced chronic liver insufficiency. The effects of the empty liposomes, ATP and phosphocreatine-containing liposomes and α -tocopherol and superoxide dismutase-containing liposomes were studied. It was found that liposomal drugs have a hepatoprotective effect, i.e. they decrease blood enzyme activity (cytolysis markers), reduce oxidative stress and preserve histologic integrity of the liver.

Key words: liposomes, liver insufficiency, lipid peroxidation.

УДК 616.146.4-005.2-06:616.36-008.64-002.2-092.9-085:615.273.036

Введение

Хроническая печеночная недостаточность (ХПН) — весьма распространенное патологическое состояние, которое развивается при длительно существующих заболеваниях. Одной из причин развития печеночной недостаточности является венозный застой, обусловленный сердечной патологией или синдромом Бада—Киари [3, 11]. Возникшая гипоксия, снижение притока и оттока метаболитов активизируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в органе, что является важным патогенетическим звеном развития печеночной недостаточности [3, 9]. В процессе

ПОЛ происходит деструкция эссенциальных фосфолипидов, среди которых важнейшим является лецитин [2, 5]. Другой причиной ХПН при нарушении кровообращения может быть снижение энергетического потенциала клеток, обусловленное низким содержанием аденозинтрифосфата (АТФ) и гибелью клеток [14].

В качестве возможного способа коррекции ХПН, обусловленной венозным застоем, может рассматриваться целенаправленная доставка необходимых препаратов в виде липосомальных форм.

Липосомы — полые частицы, содержимое которых ограничено липидной мембраной [1, 13]. В результате

взаимодействия липосом с клетками их водорастворимая часть оказывается в цитоплазме, липидная обычно включается в состав клеточных мембран [6, 8]. Характерным свойством липосом является их быстрое (в течение 1—2 ч) поглощение из кровотока органами ретикулоэндотелиальной системы, преимущественно печенью [1, 13]. В связи с этим внутривенное введение липосом может рассматриваться как способ доставки необходимых препаратов к мембранам поврежденных клеток печени.

Цель работы — оценить эффективность применения липосомальных препаратов для коррекции экспериментальной хронической печеночной недостаточности, вызванной венозным застоем.

Материал и методы

В работе использовали три вида липосом, состав липидной и внутренней водной фазы представлен в табл. 1. Липосомы готовили методом экструзии через поликарбонатные фильтры на экструдере (Lipex Biomembranes Inc., Канада). Перед экструзией при помощи ротационного испарителя (Heidolph, Германия) на стенках стеклянной колбы объемом 1 л получали липидную пленку, состоящую из яичного лецитина (Lipoid, Германия) и холестерина (Sigma, США) в молярном соотношении 7 : 5. В случае липосом, содержащих антиоксиданты, в состав липидной пленки добавляли α -токоферол (Sigma). Полученную липидную пленку гидратировали раствором внутренней фазы, встряхивали до образования мультиламеллярных везикул и подвергали десятикратной экструзии.

Таблица 1
Состав липидной и водной фаз липосом

Вид липосом	Состав липидной фазы, молярное отношение компонентов, Л : Х : Т	Внутренняя фаза липосом
«Пустые»	7 : 5 : 0	0,9% NaCl
Нагруженные макроэргическими фосфатами	7 : 5 : 0	0,9% NaCl, 2% АТФ, 2% КФ
Нагруженные антиоксидантами	7 : 3 : 1	0,9% NaCl, 2 мг/мл СОД, 2 ммоль ГТ

Эксперименты выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой тела 250—300 г в соответствии с принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Все-

мирной 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 осуществлялось постепенно, в течение 2—3 мин. В результате венозного застоя за 8 нед у экспериментальных животных развивалась ХПН [4].

Для коррекции нарушений, обусловленных венозным застоем, животным с ХПН вводили липосомальные препараты — «пустые» липосомы (ПЛ), нагруженные макроэргическими фосфатами (МЭЛ), нагруженные антиоксидантами липосомы (АОЛ) (табл. 1). Отдельной группе животных с ХПН вместо препаратов вводили физиологический раствор. Выполняли 15 инъекций в хвостовую вену с интервалом 48 ч в дозе 25 мг/липида на 1 кг массы тела животного. Через 24 ч после последнего введения (31 сут эксперимента) животных подвергали декапитации, для исследований забирали печень и кровь. Печень отмывали от крови и замораживали в жидком азоте до проведения исследований.

Всего в эксперименте использовано пять групп животных: контрольная (К) — интактные животные после инъекций 0,9%-го физиологического раствора (ФР) NaCl, ХПН + ФР, ХПН + ПЛ, ХПН + МЭЛ, ХПН + АОЛ — животные с моделированной печеночной недостаточностью, которым вводили ФР, ПЛ, МЭЛ, АОЛ соответственно. Количество животных в каждой группе 12.

В качестве критерия повреждения печени определяли активность органоспецифических ферментов в сыворотке крови и в гомогенатах печени.

Гомогенаты готовили путем измельчения навески (1 г) замороженной ткани печени в фарфоровой ступке при охлаждении. К измельченной ткани добавляли 3 мл 0,025 моль трис-НСl буфера, содержащего 0,125 моль хлорида калия, при температуре 4 °С вновь тщательно растирали в ступке. Полученную взвесь центрифугировали 10 мин при 3 000 об/мин, супернатант сразу использовали для исследований.

Определение активности гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), сорбитолдегидрогеназы (СДГ), аргиназы (АРГ) в сыворотке и гомогенатах проводили кинетическими спектрофотометрическими методами, используя диагностические наборы Kone Diagnostics

(Финляндия). Активность холинэстеразы (ХЭ) определяли по реакции с дитио-бис-нитробензойной кислотой.

Для оценки состояния процессов ПОЛ в сыворотке крови и в гомогенатах печени определяли содержание основного продукта пероксидации — малонового диальдегида (МДА), по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [10]. Определение величины суммарной антиоксидантной активности проводили с использованием метода, основанного на торможении образования МДА в водной суспензии арахидоновой кислоты [7], активность каталазы (КАТ) — по методу Аebi [12]. Все спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре Ultrospec plus (Pharmacia, Швеция).

Образцы печени фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Препараты готовили по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 7—10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 6.0 с расчетом значения выборочного среднего M и стандартной ошибки m . Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

В результате венозного застоя в группе животных ХПН + ФР отмечено значительное увеличение активности цитоплазматических ферментов в сыворотке крови по сравнению с группой контроля (табл. 2). Активность СДГ возросла на 87,2%. АРГ на 21,0%, ГГТ на 61,7%. Одновременно отмечено снижение активности фермента ХЭ. Установленные изменения свидетельствуют о развитии цитолиза гепатоцитов, нарушении синтезирующей функции печени, что в итоге можно рассматривать как печеночную недостаточ-

ность. Содержание МДА и величина АОА в сыворотке крови животных этой группы не отличались от контрольных значений.

Применение исследуемых липосомальных препаратов приводит к снижению активности печеночных ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных (табл. 2). Максимальное снижение активности ферментов, маркеров цитолиза, отмечено в крови животных группы ХПН + АОЛ, однако величина исследуемых показателей несколько превышает контрольный уровень. Активность ХЭ в крови увеличена в группах ХПН + МЭЛ на 33%, ХПН + АОЛ на 18% относительно группы ХПН + ФР, однако в группе животных ХПН + ПЛ отмечено дальнейшее снижение активности ХЭ.

Антиоксидантная активность (АОА) сыворотки крови животных после введения липосом изменялась разнонаправленно — снижалась в группе ХПН + ПЛ и увеличивалась в группах ХПН + МЭЛ и ХПН + АОЛ. Во всех опытных группах отмечено увеличение содержания МДА в сыворотке крови, относительно группы ХПН + ФР это увеличение для групп ХПН + ПЛ, ХПН + МЭЛ, ХПН + АОЛ составило 162, 148 и 128% соответственно (различия между группами статистически достоверны при $p > 0,05$).

В печени животных с ХПН + ФР (табл. 3) отмечено снижение активности СДГ на 21%, увеличение содержания МДА на 83%, снижение активности КАТ и АОА на 14 и на 28% соответственно. Введение липосомальных препаратов привело к увеличению активности СДГ в печени животных: в группе ХПН + ПЛ на 10%, на 24% — в группах ХПН + МЭЛ и ХПН + АОЛ, практически достигая контрольного уровня. Содержание МДА в печени после введения липосом снижено на 42, 10 и 50% для групп ХПН + ПЛ, ХПН + МЭЛ и ХПН + АОЛ соответственно. АОА в печени животных групп ХПН + ПЛ и ХПН + АОЛ увеличена на 8 и 36% соответственно, в группе ХПН + МЭЛ АОА снижена

Таблица 2

Активность ферментов, концентрация МДА и антиоксидантная активность сыворотки крови крыс с ХПН после введения липосом ($M \pm m$)

Группа	СДГ, мкмоль/(мл · мин)	АРГ, мкмоль/(мл · ч)	ГГТ, Ед/л	ХЭ, Ед/л	АОА, %	МДА, мкмоль/л
Контроль	19,23 ± 0,95	2,59 ± 0,11	28,86 ± 1,17	427,8 ± 12,5	33,28 ± 1,32	6,54 ± 0,35
ХПН + ФР	36,01 ± 0,95*	6,14 ± 0,09*	46,66 ± 1,15*	241,8 ± 5,2*	34,76 ± 1,31	6,56 ± 0,28
ХПН + ПЛ	32,34 ± 0,99*.#	4,78 ± 0,19*.#	41,10 ± 1,59*.#	227,8 ± 8,9*.#	23,33 ± 1,08*.#	17,21 ± 0,68*.#
ХПН + МЭЛ	33,19 ± 1,23*.#	3,36 ± 0,14*.#	36,71 ± 1,67*.#	321,3 ± 9,1*.#	31,11 ± 0,86#	16,31 ± 0,70*.#
ХПН + АОЛ	28,38 ± 0,98*.#	2,86 ± 0,10#	34,77 ± 0,96*.#	284,3 ± 9,5*.#	37,53 ± 1,46#	14,89 ± 0,24*.#

Примечание. Здесь и в табл. 3: * — достоверность различий с группой контроля при $p < 0,05$; # — достоверность различий с группой ХПН + ФР при $p < 0,05$.

Таблица 3

Активность сорбитолдегидрогеназы и показатели ПОЛ в печени крыс ($M \pm m$)				
Группа	СДГ, ммоль/(г · ч)	МДА, мкмоль/г	КАТ, мкм/(г · мин)	АОА, %
К + ФР	221,0 ± 9,2	5,02 ± 0,11	44,02 ± 1,05	36,50 ± 1,29
ХПН + ФР	175,6 ± 6,6*	9,22 ± 0,17*	37,62 ± 0,56*	25,83 ± 0,87*
ХПН + ПЛ	193,1 ± 10,1#	5,34 ± 0,27#	37,45 ± 1,27*	27,84 ± 0,75*.#
ХПН + МЭЛ	217,7 ± 8,2#	8,26 ± 0,32#	35,70 ± 1,10*	20,38 ± 1,02*.#
ХПН + АОЛ	218,3 ± 7,8#	4,60 ± 0,16#	37,37 ± 0,94*	35,15 ± 1,10#

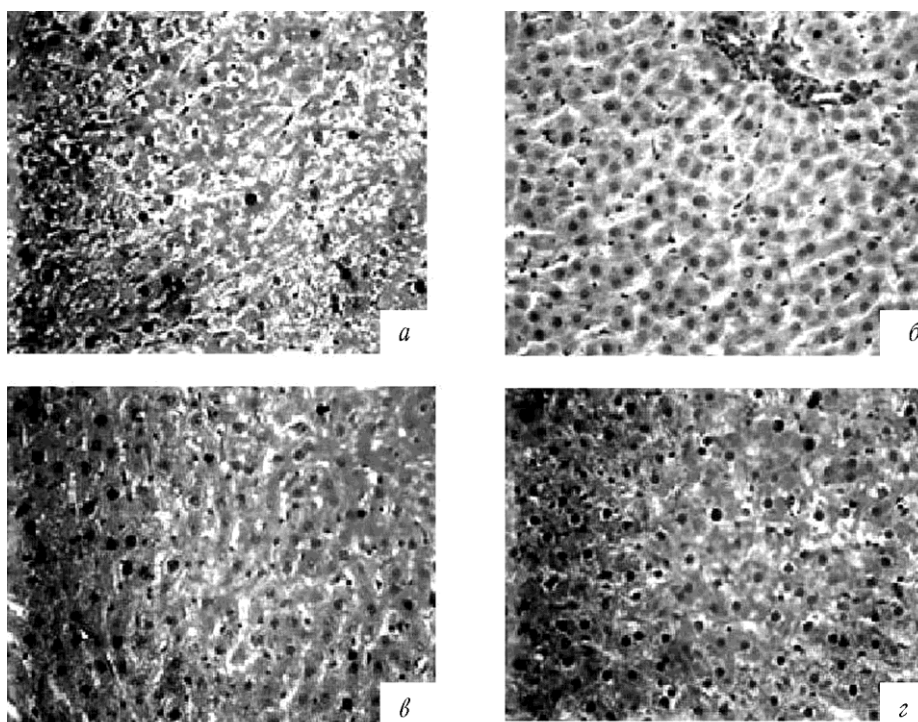


Рис. 1. Структура печени после моделирования ХПН и введения липосом: а — ХПН + ФР; б — ХПН + АОЛ; в — ХПН + МЭЛ; г — ХПН + ПЛ. Окраска — гематоксилин и эозин. Ув. 400

на 20% по сравнению с ХПН + ФР. Активность КАТ для всех групп с введением липосом не имела достоверных различий с группой ХПН + ФР.

Гистологические исследования печени при ХПН и введении крысам липосомальных препаратов выявили следующие изменения. В группе животных, которым моделировали ХПН и вводили эквивалентное количество физиологического раствора, отмечали следующее: выраженную деструкцию печеночных балок, нарушение сосудистого рисунка, множественные очаги воспаления, иногда сопровождающиеся очагами некроза (рис. 1,а). Гепатоциты в большинстве имели признаки баллонной дистрофии. Ядра клеток были пикноморфными. У части гепатоцитов изменены тинкто-

риальные свойства, и их цитоплазма выглядела более темной.

После введения липосомальных препаратов отмечена положительная динамика изменений, которая выражалась в частичном восстановлении балок печени и практически полном отсутствии очагов некротизации. Отмечены элементы снижения дистрофических проявлений в гепатоцитах. Снижено количество регистрируемых очагов воспаления.

Данные морфологического исследования печени свидетельствуют о протективном характере действия липосомальных препаратов. Наиболее выражен эффект в группе ХПН + АОЛ (рис. 1,б), менее выражен

ный эффект отмечен в печени животных групп ХПН + МЭЛ (рис. 1,б) и ХПН + ПЛ (рис. 1,з).

Обсуждение

Как было установлено ранее [4], через 8 нед после частичной перевязки печеночных вен у животных развивается ХПН, что подтверждает значительное повышение активности ферментов в сыворотке крови.

Увеличение продолжительности экспериментального венозного застоя до 12 нед (ХПН + ФР) приводит к более значительным изменениям исследуемых показателей. Повышение активности печеночных ферментов свидетельствует о нарушении селективной проницаемости плазматических мембран клеток печеночной паренхимы и клеточном некрозе. Снижение активности СДГ в печени животных позволяет предположить нарушение белоксинтезирующей функции гепатоцитов. В печени животных с ХПН + ФР возрастает содержание МДА, снижается АОА и активность КАТ, что говорит о возрастании активности процессов липопероксидации и снижении антиоксидантного потенциала гепатоцитов. Причиной активации ПОЛ в условиях данного эксперимента может быть энергодефицит и гипоксия, обусловленные венозным застоем.

Для коррекции экспериментальной ХПН у крыс использовали три вида липосом. ПЛ — содержат в своем составе важнейший эссенциальный фосфолипид — лецитин, поэтому ПЛ могут рассматриваться как источник лецитина для поврежденных мембран гепатоцитов или даже в качестве мембранной «заплатки» для поврежденных клеточных мембран [5]. Применение липосом, содержащих во внутренней фазе макроэргические фосфаты (МЭЛ), обеспечивает доставку в клетки печени дополнительных макроэргов для коррекции энергодефицита, возникающего при гипоксии печени [14]. АОЛ, содержащие α -токоферол, супероксиддисмутазу и восстановленный глутатион, можно рассматривать как средство доставки дополнительных антиоксидантов в поврежденные клетки печени, что позволяет скорректировать антиоксидантную обеспеченность клеток печени.

Использование ПЛ при экспериментальной ХПН несколько уменьшило интенсивность цитолиза гепатоцитов; повышение активности ХЭ в крови и СДГ в печени позволяет говорить о коррекции синтетической функции гепатоцитов. Присутствие липосом ограничило интенсивность ПОЛ в печени, а повышение

активности антиоксидантных систем нивелирует проявления окислительного стресса, обусловленного нарушением кровообращения.

Введение МЭЛ обеспечивает более эффективное снижение активности печеночных ферментов в сыворотке крови по сравнению с ПЛ. Более значительное повышение активности ХЭ в сыворотке крови и СДГ в печени животных указывает на усиление в печени процессов биосинтеза ферментов. Вместе с тем степень коррекции оксидативных нарушений, обусловленных ХПН, при использовании МЭЛ была самой низкой по сравнению с другими липосомальными препаратами.

Использование липосомальных препаратов, содержащих антиоксиданты, оказало максимальный эффект, что подтверждает значительное снижение выхода в кровь цитоплазматических ферментов, существенное повышение АОА в сыворотке и печени животных, снижение МДА в печени.

Нельзя не заметить факт увеличения содержания МДА в сыворотке крови при введении любого из изученных липосомальных препаратов. Даже при введении в составе липосом антиоксидантов (АОЛ) на фоне повышения АОА в сыворотке животных концентрация МДА значительно превышала этот показатель в крови животных без введения липосом. В крови животных группы ХПН + ФР, которым не вводили липосомальные препараты, уровень МДА не превышает контрольных значений. По-видимому, липиды, входящие в состав липосом, могут служить дополнительным субстратом для процессов ПОЛ в крови, что в итоге приводит к увеличению концентрации продуктов ПОЛ.

Таким образом, использование экспериментальной модели ХПН позволило исследовать метаболические нарушения не только в крови, но и в ткани печени и определить эффективность исследуемых липосомальных препаратов для коррекции нарушений, обусловленных венозным застоем в печени. Можно предположить, что введение липосомальных препаратов, состоящих из лецитина и холестерина, способно оказывать восстанавливающий эффект на поврежденные клеточные мембраны печени, что проявляется в снижении выхода цитоплазматических ферментов в кровь. Установлен мембраностабилизирующий эффект применения липосомальных препаратов, «нагруженных» макроэргическими фосфатами и антиоксидантами. Необходимы дальнейшие исследования эффекта

липосом, однако на данном этапе можно с уверенностью говорить о перспективности использования липосомальных препаратов для направленной доставки необходимых соединений к поврежденным клеткам печени и органу в целом.

Выводы

1. Применение липосомальных препаратов снижает выраженность цитолиза при экспериментальной печеночной недостаточности, обусловленной венозным застоем.

2. Липосомальные препараты, содержащие комплекс антиоксидантов, обеспечивают не только коррекцию печеночных нарушений, но и снижают выраженность окислительного стресса, являющегося важным повреждающим звеном при хронической печеночной недостаточности.

Литература

1. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 10. С. 3—9.
2. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М.: Медицина, 1989. 368 с.
3. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение. Н. Новгород: Покровка, 1999. 318 с.
4. Воронцова Н.Л., Мухамадияров Р.А., Журавлёва И.Ю. Моделирование застойной печеночной недостаточности в эксперименте на крысах // Вестн. мед. стоматол. ин-та [В печати].
5. Ипатов О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике. М.: ГУ НИИ биомедхим. РАМН, 2005. 318 с.
6. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. М.: Наука, 1986. 240 с.
7. Промыслов М.Ш., Демчук М.Д. Модификация метода

определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови // Вопр. мед. химии. 1990. № 4. С. 90—92.

8. Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов. М.: Глобус Континенталь, 2010. 242 с.
9. Сергеева Г.И., Князькова Л.Г., Могутнова Т.А. и др. Острофазовый ответ и биотрансформационная активность печени после операции на открытом сердце // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2006. № 1. С. 31—35.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой // Современные методы в биохимии / под ред. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66—67.
11. Abinales J.G., Pasarín M., Pagán J.C.G. Animal models of portal hypertension // World J. Gastroenterol. 2006. V. 41, № 12. P. 6577—6584.
12. Aebi H. Catalase *in vitro* // Meth. Enzymol. 1984. V. 105. P. 121—126.
13. Allen T.M. Pharmacokinetics and biopharmaceutics of lipid-based drug formulations // Liposome Technology. V. 3 / ed. by G. Gregoriadis. Informa Healthcare USA, Inc. 2007. P. 49—55.
14. Korb V., Tep K., Escriou V. et al. Current data on ATP-containing liposomes and potential prospects to enhance cellular energy status for hepatic applications // Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst. 2008. V. 25, № 4. P. 305—345.

Поступила в редакцию 14.11.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

Р.А. Мухамадияров — канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований тканей отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

Н.Л. Воронцова — канд. биол. наук, ведущий науч. сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

В.В. Борисов — канд. биол. наук, зав. лабораторией ультраструктурных исследований тканей отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

Ю.А. Кудрявцева — д-р биол. наук, зав. лабораторией новых биоматериалов отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

И.Ю. Журавлёва — д-р мед. наук, главный науч. сотрудник отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

Для корреспонденции

Мухамадияров Р.А., Воронцова Н.Л., Борисов В.В. и др. Сравнительная оценка эффективности липосомальных препаратов...

Мухамадияров Ринат Ахматович, тел.: 8-923-610-6747, 8 (3842) 64-38-02; e-mail: rem57@rambler.ru