

УДК 577. 352. 24: 615. 451.234.012

©Коллектив авторов

ИНКОРПОРИРОВАНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО КОМПЛЕКСА "БИЕН" В МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫЕ ЛИПОСОМЫ

И.М. Бушмакина, Н.И. Дроздова, М.А. Мартынова*

ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", 220072,
Минск, Беларусь, ул. Академическая, 27; тел.: (017) 2842361; факс: (017) 2842359;
эл. почта: bushm-im@yandex.ru

Изучены физико-химические условия включения "биена" в мультиламеллярные липосомы, сформированные методом механического диспергирования (вортэксирования). Показано, что инкорпорирование лекарственной субстанции в мультиламеллярные липосомы зависит от состава липосомообразующей смеси, концентрации суммарных липидов, "биена" и наличия антиоксиданта. Определены режимы вортэксирования и последующей инкубации липосом, позволяющие получать однородную суспензию липосомальной формы "биена". Проведена оценка степени антиоксидантной защиты липосомальной субстанции различными концентрациями DL- α -токоферола и роли удельного содержания холестерина в развитии перекисного окисления липидов в липосомальном "биене".

Ключевые слова: комплекс жирных кислот "биен", яичный фосфатидилхолин, холестерин, вортэксирование, мультиламеллярные липосомы, перекисное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ. В последнее десятилетие РУП "Белмедпрепараты" налажено производство серии лекарственных средств на основе "биена" – комплекса этиловых эфиров высших жирных кислот, получаемого микробиологическим синтезом из биомассы мицелиального гриба *Entomophthora virulenta* семейства *Entomophthoraceae*, класс *Zygomycetes*, штамм "Е.ИНМИ" и α -токоферола ацетата. В состав "биена" входят одиннадцать жирных кислот, в том числе и полиненасыщенные: арахидоновая (предшественник простагландинов и лейкотриенов), олеиновая, линолевая и линоленовая. Они являются важными компонентами мембран и источниками аутокоидов – универсальных низкомолекулярных биорегуляторов функциональной активности клеток и тканей. При наружном применении "биен" стимулирует репаративные процессы в соединительной и эпителиальной тканях, усиливает синтез ДНК в коже и биосинтез коллагена, оказывает выраженную стимуляцию пролиферации фибробластов и эпителизации ран и ожогов [1-4]. При внутреннем применении "биен" не только высоко активен при язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, язвенно-некротических поражениях слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, но и эффективен как антиатеросклеротический и гепатопротекторный препарат [2, 5, 6]. Таким образом, можно ожидать, что уникальный природный комплекс полиеновых жирных кислот, входящих в состав субстанции "биена", будет проявлять высокую репаративную и

* - адресат для переписки

цитопротекторную активность и при лечении широкого круга бронхо-легочных патологий в случае создания липосомальной лекарственной формы для ингаляций за счет синергизма действия фосфолипидной и жирнокислотной составляющих.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных физико-химических факторов на получение липосомальной формы жирнокислотного комплекса "биен".

МЕТОДИКА. В работе использовали коммерческие реактивы: "биен" (РУП "Белмедпрепараты", Беларусь), яичный фосфатидилхолин (ЯФХ) (ЗАО "Биолек", Украина), холестерин (ХС) ("Reanal", Венгрия) и DL- α -токоферол ("Sigma", США). Мультиламеллярные липосомы (МЛЛ) формировали методом высокоскоростного механического диспергирования (вортэксирования). Для получения липосом раствор липосомообразующих компонентов, включая и "биен", в хлороформе упаривали на роторном испарителе до получения сухой липидной пленки. Далее в колбу вносили 0,1 М Na-фосфатный буфер, содержащий 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,4 и заполняли ее азотом. Липосомы получали путем вортэксирования на высокоскоростном миксере, которое вели при температуре 60°C, что выше температуры фазовых переходов липидов, формирующих липосомальную мембрану. Затем полученную суспензию инкубировали при 40°C для стабилизации липосомального контейнера.

Количественную оценку размеров МЛЛ проводили с помощью метода электронной микроскопии. Степень инкапсулирования препарата в мультиламеллярные липосомы определяли гель-фильтрацией полученной липосомальной суспензии на колонках, заполненных сефадексом G-75.

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) инициировали добавлением системы (Fe^{2+} + аскорбат натрия) в присутствии кислорода воздуха. Аскорбат натрия и Fe^{2+} в виде соли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вносили в суспензию липосом в конечной концентрации по 20 мМ, и образцы продували воздухом (1,0 л/мин) в течение 2 ч. Определяли индекс окисленности, который отражает долю липидов, окисленных до диеновых конъюгатов, по методу Klein [7].

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре "SOLAR" (Беларусь). Регистрировали степень поляризации флуоресценции липофильного зонда – 1,6-дифенил-3,5-гексатриена (ДФГТ) ("Serva", Германия) по методу, описанному в работе [8]. Зонд вводили в суспензию липосом в растворе тетрагидрофурана и инкубировали при температуре 28°C в течение 90 мин. Конечная концентрация ДФГТ в пробах составляла 2 мкМ. Длительность инкубации суспензии с зондом и его оптимальная концентрация были определены в серии предварительных экспериментов по изучению кинетики включения ДФГТ в липосомальную мембрану. Использованы соответствующие длины волн возбуждения и регистрации: $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 430$ нм.

С целью получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили не менее 3 раз. Обработку данных осуществляли методами вариационной статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Инкорпорирование лекарственного средства в мультиламеллярные липосомы и стабильность полученной липосомальной суспензии зависит, главным образом, от состава липосомообразующей смеси, концентрации суммарных липидов и активного вещества, наличия антиоксидантов и длительности диспергирования с последующей инкубацией полученной субстанции.

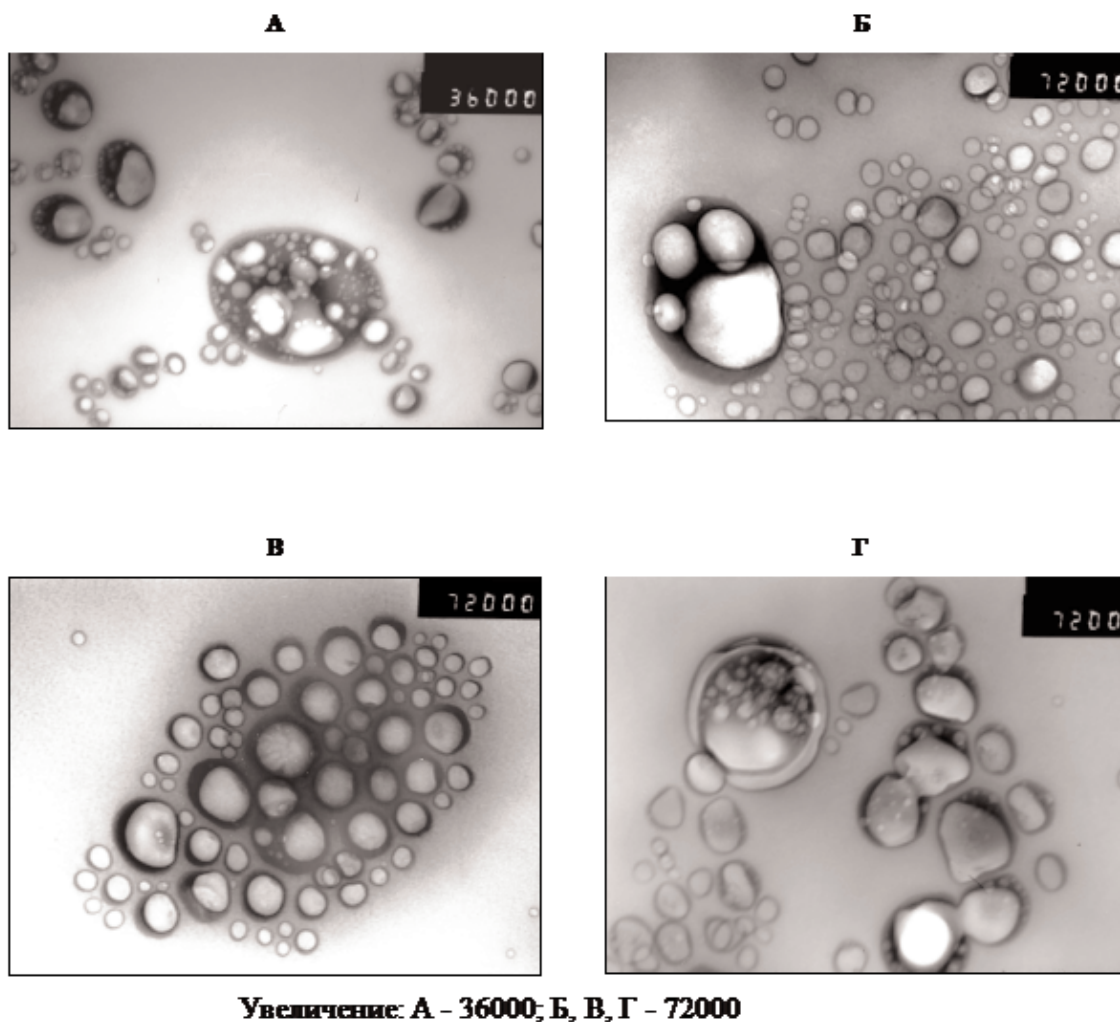
В качестве основных компонентов липосомообразующей смеси использовали яичный фосфатидилхолин и холестерин в различных молярных соотношениях. Для предотвращения перекисного окисления липидов добавляли антиоксидант DL- α -токоферол из расчёта 0,05 мг на 1 мг липидов. Формировали липосомальную форму жирнокислотного комплекса, в котором доля холестерина в составе мембраны липосом по отношению к фосфолипиду изменялась от 0 до 80% (в молярном содержании). Дальнейшее повышение удельной доли холестерина

препятствовало образованию липосом. Следует учитывать, что химическая природа активного вещества (комплекс жирных кислот) приводит к его встраиванию в состав липосомальных мембран. получали Таковую форму "биена" получали при использовании концентрации основных липидных составляющих липосомообразующей смеси ЯФХ и ХС (суммарных липидов) - 25 мг/мл суспензии. Несмотря на то, что и сам "биен", и антиоксидант тоже инкорпорированы в липосомальную мембрану, по количественному содержанию в ней они являются минорными компонентами.

Как видно из таблицы 1, максимального уровня инкапсулирования жирнокислотного комплекса в мультиламеллярные липосомы удается добиться при использовании соотношения липосомообразующих компонентов ЯФХ : ХС, 10 : 5 (моль/моль). Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что такое соотношение основных липосомообразующих компонентов является оптимальным, поскольку приводит к формированию стабильных, одиночных липосом округлой формы (рис. 1), при этом большая часть везикул в липосомальной суспензии ($76,2 \pm 2,5\%$) имеет размеры 0,1–0,5 мкм.

Таблица 1. Влияние состава основных липосомообразующих компонентов на эффективность включения "биена" в липосомы

Состав липосомального контейнера, моль/моль	Степень инкорпорирования жирнокислотного комплекса "биен" в мультиламеллярные липосомы, %	
	<i>свежеприготовленные МЛП</i>	<i>МЛП после 6-ти мес. хранения</i>
ЯФХ : ХС, 10 : 0	$17,2 \pm 1,5$	$1,4 \pm 0,2$
ЯФХ : ХС, 10 : 1	$24,5 \pm 1,2$	$4,8 \pm 0,3$
ЯФХ : ХС, 10 : 2	$29,1 \pm 2,1$	$8,4 \pm 1,2$
ЯФХ : ХС, 10 : 3	$33,8 \pm 2,8$	$14,1 \pm 2,0$
ЯФХ : ХС, 10 : 4	$43,8 \pm 3,0$	$36,6 \pm 0,7$
ЯФХ : ХС, 10 : 5	$53,3 \pm 0,8$	$50,0 \pm 1,5$
ЯФХ : ХС, 10 : 6	$53,0 \pm 1,9$	$46,4 \pm 2,1$
ЯФХ : ХС, 10 : 7	$25,3 \pm 1,8$	$10,1 \pm 0,5$
ЯФХ : ХС, 10 : 8	$23,2 \pm 1,4$	$7,8 \pm 0,3$



Увеличение: А - 36000; Б, В, Г - 72000

Рисунок 1.

Электронные фотографии липосомального "биена" при различных соотношениях яичного фосфатидилхолина и холестерина в мембране липосом: ЯФХ : ХС = А - 10 : 0; Б - 10 : 3; В - 10 : 5; Г - 10 : 8 моль/моль.

Влияние холестерина на физическое состояние липосомальной мембраны, содержащей "биен", изучали по результатам измерения степени поляризации флуоресценции липофильного зонда ДФГТ, встроенного в липосомы. Как и следовало ожидать, было обнаружено, что по мере повышения доли холестерина в мембране липосомального "биена" регистрируется увеличение степени поляризации флуоресценции зонда, свидетельствующее о росте микровязкости липидного бислоя. Эффект наблюдается при использовании различных соотношений яичного фосфатидилхолина и холестерина от уровня ЯФХ : ХС = 10 : 1 до 10 : 5 (моль/моль), после чего кривая выходит на плато (рис. 2, кривая 1).

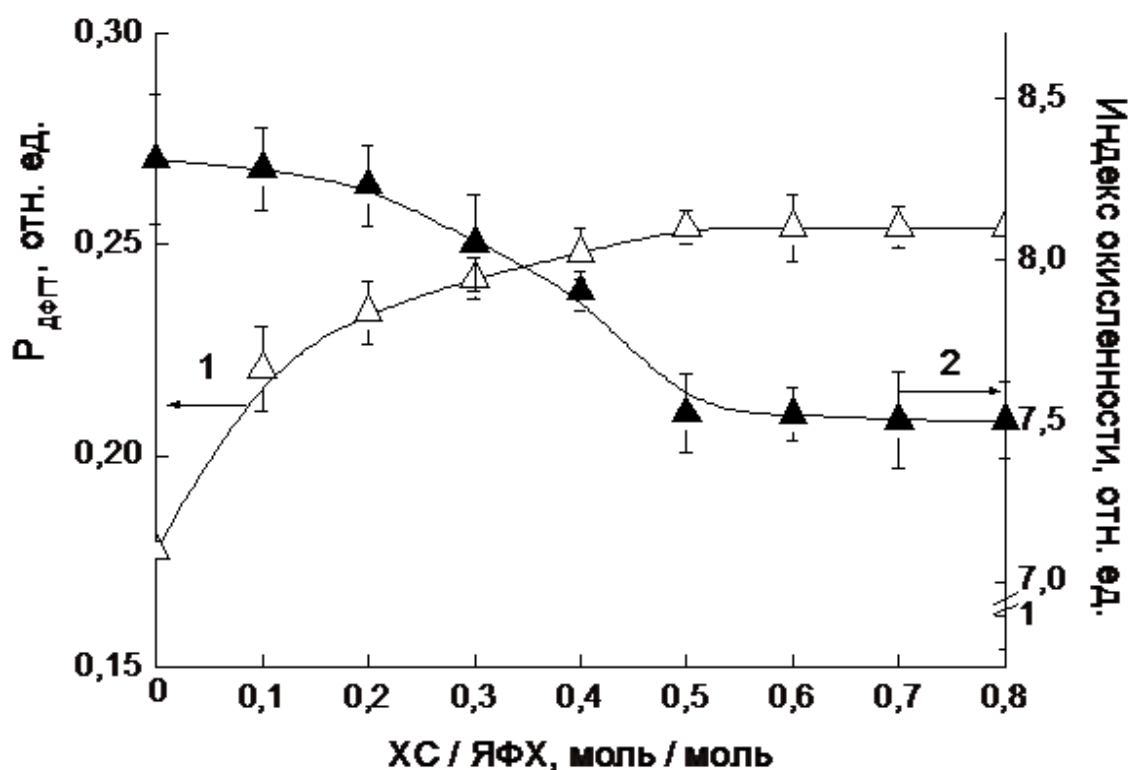


Рисунок 2.

Влияние соотношения холестерина и яичного фосфатидилхолина в мембране липосомального "биена" на степень поляризации флуоресценции ДФГТ, встроенного в липосомы (1), и на (Fe²⁺ + аскорбат натрия) - индуцированное накопление продуктов ПОЛ в свежеприготовленных липосомах (2).

Нами была исследована стабильность липидного бислоя липосомального "биена" в зависимости от содержания в нем холестерина. Проведена оценка влияния удельного содержания холестерина на развитие перекисного окисления липидов в липосомальном "биене". При инициации процессов ПОЛ системой Fe²⁺ + аскорбат натрия установлено, что введение в липосоμοобразующий состав уже минимальной концентрации холестерина снижает уровень индекса окисленности липидов (рис. 2, кривая 2) в МЛЛ, содержащих "биен". По мере роста доли холестерина в мембранах липосом наблюдается ингибирование реакций перекисного окисления липидов вплоть до достижения соотношения ХС / ЯФХ = 0,5 (моль/моль). При дальнейшем увеличении удельной концентрации холестерина индекс окисленности липидов, характеризующий долю липидов, окисленных до диеновых конъюгатов, практически не меняется. Установлено, что такие липосомы (содержащие ЯФХ и ХС в молярном соотношении 10 : 5) эффективно удерживают комплекс ненасыщенных жирных кислот: инкорпорирование "биена" в МЛЛ после 6-ти мес хранения практически не изменяется (см. табл. 1).

Обеспечение стабильности липосомального препарата, в том числе и предотвращение развития процессов ПОЛ при хранении, является одной из важнейших задач при создании лекарственной формы. В связи с этим проводилась оценка содержания продуктов ПОЛ в образцах липосомального "биена" в зависимости от сроков хранения. Для этого свежеприготовленную субстанцию липосомального "биена" разливали в пенициллиновые флаконы и продували потоком инертного газа (азота), что, как известно, также снижает риск запуска процессов ПОЛ. Флаконы хранили при температуре +(2-4)°C без доступа света.

ИНКОРПОРИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА "БИЕН" В ЛИПОСОМЫ

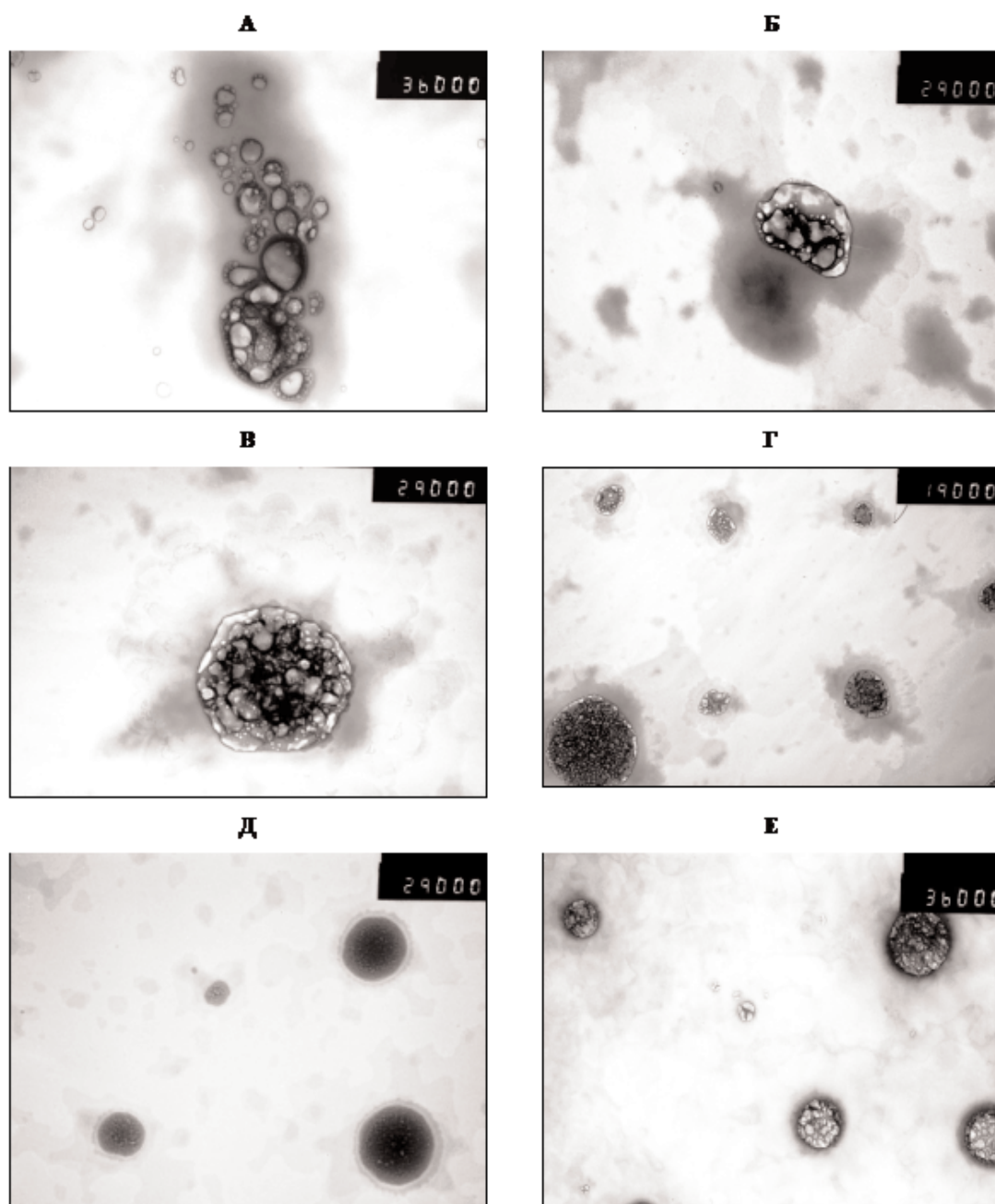
В составе липосом присутствовал DL- α -токоферол (за исключением контроля) в концентрациях от 0 до 0,1 мг/мг суммарных липидов. Необходимо отметить, что, по данным электронной микроскопии, рост концентрации антиоксиданта в мембране приводит лишь к незначительному увеличению размера полученных липосом, к тому же он не влияет и на встраивание жирнокислотного комплекса в МЛЛ. Установлено, что при концентрациях 0,05-0,06 мг/мг липидов DL- α -токоферол эффективно стабилизирует процессы ПОЛ в липосомальной субстанции жирнокислотного комплекса "биен" на протяжении 6-ти мес. Уровень индекса окисленности в таких липосомах составил $1,041 \pm 1,017$ отн. ед., т. е. не достигал значений этого параметра даже в свежеприготовленных контрольных образцах без антиоксиданта ($1,134 \pm 0,026$ отн. ед.).

Гидрофобные свойства "биена" позволяют предположить, что увеличения степени его включения в липосомы можно добиться, повышая концентрацию основных суммарных липидов, входящих в липосомообразующую смесь. В серии экспериментов оценивали влияние различных концентраций основных суммарных липидов (от 10 до 50 мг/мл суспензии) и "биена" (от 0,01 до 0,03 мг/мг суммарных липидов) на эффективность включения активного вещества и стабильность липосомальных форм при хранении (табл. 2). Оказалось, что оптимальной концентрацией основных суммарных липидов является 25 мг/мл суспензии и "биена" - 0,03 мг/мг суммарных липидов, поскольку при этом формируются стабильные при хранении (о чем свидетельствуют данные по изучению микровязкости липосомальной мембраны, накоплению в ней продуктов перекисного окисления липидов и результаты электронной микроскопии) мультиламеллярные липосомы с уровнем инкапсулирования терапевтического агента $53,3 \pm 0,8\%$ от внесённого в инкубационную смесь.

Таблица 2. Влияние концентрации суммарных липидов и "биена" в липосомообразующей смеси на эффективность инкорпорирования лекарственной субстанции в МЛЛ.

Концентрации суммарных липидов, мг/мл суспензии	Концентрация "биена", мг/мг суммарных липидов	Эффективность включения "биена", % от исходного содержания
10	0,01	$37,5 \pm 1,50$
10	0,03	$33,3 \pm 0,2$
25	0,01	$40,1 \pm 1,9$
25	0,03	$53,3 \pm 0,8$
50	0,01	$40,0 \pm 0,5$
50	0,03	$42,6 \pm 1,6$
75	0,01	—

Известно, что на размер получаемых везикул существенно влияет состав липосомообразующей композиции. Еще в большей степени их размер зависит от времени диспергирования смеси при формировании липосом. Изучено влияние длительности вортэксирования при 60°C (от 5 до 15 мин) и последующей инкубации (от 0 до 1,5 ч) суспензии липосом при 40°C на распределение полученных МЛЛ по размерам. Наиболее гомогенной оказалась субстанция, полученная при вортэксировании смеси в течение 5 минут и последующей инкубации суспензии в течение 1 часа: при этом более 60% везикул имеют размер от 0,05 до 0,1 мкм, диаметр 30% везикул колеблется от 0,1 до 0,5 мкм, и около 10% МЛЛ имеют размер менее 0,05 мкм. Кроме того, такие липосомы оказываются стабильными и при хранении липосомального "биена": сохраняют свою форму, размер и не агрегируют (рис. 3).



Увеличение: А, Б - 36000; Б, В, Д - 29000; Г - 19000

Рисунок 3.

Электронные фотографии свежеприготовленного (А, В, Д) и после 6-ти мес хранения (Б, Г, Е) липосомального "биена" при различном времени инкубации липосом после формирования:
А, Б - 0; В, Г - 30; Д, Е - 60 мин.

Полученные в ходе работы результаты позволяют сделать вывод, что определены условия формирования липосомальной лекарственной субстанции "биена" методом вортэкспирования с эффективностью включения активного вещества до 50%.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ № БО7М-177 от 1 апреля 2007 г. (№ госрегистрации 20071828 от 25.07.07.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедова Л.Н., Федорова И.Н. (2006) Белорусский медицинский журнал, **1**(15), 46-49.
2. Гамель И.В., Петров П.Т., Царенков В.М. (1998) Новости фармации, **1**, 38–40.
3. Дедова Л.Н., Федорова И.Н., Петров П.Т. (2004) Достижения медицинской науки Беларуси, **9**, 237-238.
4. Feodorova I., Dedova L., Petrov P. (2004) in: 3th International Congress, Constanta, p.51.
5. Петров П.Т., Царенков В.М., Кевра М.К., Скрипко А.Д., Кевра Ж.С., Таганович Н.Д. (2000) VII Рос. национальный конгресс "Человек и лекарство", Москва, 540.
6. Петров П.Т. (2004) Материалы Седьмого съезда фармацевтов Республики Беларусь "Фармация XXI века", Витебск, 291-294.
7. Klein R.A. (1970) Biochim. Biophys. acta, **210**, 486–489.
8. Lentz B.R., Barenholz Y., Thompson T.E. (1976) Biochemistry, **15**(20) 4521-4528.

Поступила: 26. 02. 2008.

FATTY ACID COMPLEX "BIEN" INCORPORATION INTO LIPOSOMES MULTILAYERED

I.M. Bushmakina, N.I. Drozdova, M.A. Martynova

The Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus; tel.: (017) 2842361; fax: (017) 2842359;
e-mail: bushm-im@yandex.ru

The conditions of fatty acid complex "bien" incorporation into multilayered liposomes prepared by mechanical dispersion techniques (vortexing) have been investigated. Drug incorporation depends on the lipid composition used to prepare the vesicles, overall lipid and "bien" concentrations and the presence of an antioxidant. Vortexing and incubation regimes for the homogeneous liposomal suspension were determined. The effects of contents of DL- α -tocopherol and cholesterol on lipid peroxidation were evaluated.

Key words: fatty acid complex "bien", egg yolk phosphatidylcholine, cholesterol, vortexing techniques, multilayered liposomes, lipids peroxidation.