

УДК 616-001.32-018:577.158]-092-085.36

© Коллектив авторов, 2012.

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕСС ПРИ СИНДРОМЕ ДЛИТЕЛЬНОГО РАЗДАВЛИВАНИЯ И ЕГО ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ НАНОПРЕПАРАТОМ ЛИПОСОМ

В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев, С. В. Колесникова, С. В. Пищулина, Л. П. Линчевская

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, кафедра патофизиологии (зав. – член-корр. НАМН Украины, проф. В.Н. Ельский), г. Донецк.

OXIDATIVE STRESS AT CRASH-SYNDROME AND HIS PATHOGENETIC CORRECTION BY LIPOSOME NANOPREPARATION

V.N. Jelski, S.V. Zablitsev, S.V. Kolesnikova, S.V. Pishulina, L.P. Linchevskaya

SUMMARY

To set kind of influencing of liposome nanopreparation on the state of oxidative stress and antioxidant activity at crash-syndrome was research purpose. To give the theoretical ground of expedience of the use of liposome for correction of violations of lipid peroxidation and declines of lethality at crash-syndrome. Infusion of liposome nanopreparation resulted in normalization of lipid peroxidation processes and caused a considerable protective effect, multiplying the survivability of animals. We first set ability liposome nanopreparation to fixed products of lipid peroxidation, reducing their maintenance and to promote antioxidant activity. A antioxidant role of liposome in the system of biochemical defense of cage from damaging action of free radicals and products of lipid peroxidation is set. It allows to recommend liposome nanopreparation inclusion in complex pathogenetic therapy at crash-syndrome.

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС ПРИ СИНДРОМІ ТРИВАЛОГО РОЗЧАВЛЮВАННЯ ТА ЙОГО ПАТОГЕНЕТИЧНА КОРЕКЦІЯ НАНОПРЕПАРАТОМ ЛІПОСОМ

В.М. Єльський, С.В. Зябліцев, С.В. Колеснікова, С.В. Піщуліна, Л.П. Лінчевська

РЕЗЮМЕ

Актуальність проблеми визначена зростанням травматизму, пов'язаного з екстремальними ситуаціями на виробництві, особливо в гірничодобувній промисловості, транспорті і при стихійних лихах. Метою дослідження було встановити характер впливу нанопрепарату ліпосом на стан оксидативного стресу, активність антиоксидантної системи в субклітинних фракціях (лізосоми і мітохондрії) серця, печінки, нирок в динаміці синдрому тривалого розчавлювання (СТР). Дати теоретичне обґрунтування доцільності використання ліпосом для корекції порушень ліпідної пероксидації і зниження летальності при СТР. Інфузія нанопрепарату ліпосом при СТР призвела до нормалізації процесів ПОЛ, зростанню біоантиоксидантної активності, чим сприяла стабілізації клітинних і субклітинних мембран, тобто викликала значний захисний ефект, збільшивши при цьому виживаємість тварин до 96 %. Нами вперше встановлено здатність ліпосом зв'язувати продукти ПОЛ, знижуючи їх вміст і підвищувати активність АОС в серці, печінці, нирках на внутріклітинному рівні, що приводило до збільшення резистентності тканин до травми. Встановлення антиоксидантної ролі ліпосом в системі біохімічного захисту клітини від пошкоджувальної дії вільних радикалів і продуктів ПОЛ при СТР дозволяють рекомендувати включення ліпосом в комплексну патогенетичну терапію СТР.

Ключевые слова: оксидативный стресс, нанопрепарат липосом, синдром длительного раздавливания.

Автором одной из первых публикаций о липосомах в 1965 был английский ученый Алеко Бангхемом (Bangham A.D., 1921-2010 гг.). Занимаясь вопросами влияния фосфолипидных веществ на процесс свертывания крови и изучая образующиеся при набухании фосфолипидов дисперсные структуры, ученый заметил на микрофотографиях слоистые везикулы, с похожей на клеточные мембраны структуры. Первая публикация, посвященная липосомом была опубликована в журнале "Молекулярная биология" и называлась "Диффузия одновалентных ионов через слой набухших фосфолипидов". Дальнейшие исследования показали, что эти самоорганизующиеся самообразующиеся в водной среде везикулы заключают внутрь часть окружающего водного раствора и в дальнейшем

могут обмениваться с наружным раствором благодаря полупроницаемым свойствам своей мембраны.

В настоящее время существуют различные методы изготовления липосом, позволяющие получать эти везикулы различного размера, состава, структуры и внутреннего объема. Диаметр липосом может варьировать от 25 до 10000 нм, в связи с чем различают маленькие, средние и большие липосомы; в зависимости от количества оболочек выделяют уни-, олиго-и мультиламелярные липосомы. Униламелярные липосомы имеют всего один липидный бислой и средний диаметр от 25 до 250 нм, олиголамелярные – два, при этом. Соответственно мультиламелярные липосомы имеют много фосфолипидных слоев. Диаметр мультиламелярных везикул составляет от 500 до 5000 нм. На искусственно

создаваемых липосоммах изучали процессы трансмембранного переноса веществ, возможности изменения структуры под влиянием различных факторов и т.п. В дальнейшем появилась идея использовать липосомы в качестве переносчиков или контейнеров различных лекарственных препаратов. Липосомы, состоящие из натуральных фосфолипидов являются иммунологически инертными, нетоксическими структурами, что очень важно для минимизации побочных эффектов. Кроме того, очень привлекательной является возможность использования этих частиц и для транспортировки гидрофильных и для переноса гидрофобных препаратов благодаря липидной оболочке и водной внутренней части [12]. Т.о. липосомы весьма интересны в связи с их: 1) достаточно высокой стабильностью, 2) длительностью циркуляции, 3) различными областями использования, 4) новыми тенденциями липосомных технологий “stealth liposomes”, в том числе нанотехнологиями их получения 5) возможностью снижения токсических эффектов препаратов, в частности химиотерапии, 6) возможностью повышения допустимой концентрации антибиотика в связи с возможностью прицельной внутриклеточной доставки препарата, например при туберкулезе [5, 6, 17].

Свойства липосом в качестве переносчиков лекарственных препаратов интересны и с той позиции, что возможна так называемая целевая доставка, что очень важно, т.е. влияние непосредственно на “мишени”. Например, после внутривенного введения липосомы захватываются мононуклеарами, в связи с чем целесообразным является инкапсуляция внутрь везикул препаратов, активирующих макрофагальную систему, иммуномодуляторов, а также антибиотиков и антипаразитарных лекарственных средств для целенаправленного лечения таких заболеваний, как лейшманиоз и т.п. В то же время, если орган-мишень или ткань-мишень находится вне мононуклеарной системы, захват и разрушение лизосом фагоцитами является недостатком использования везикул в качестве переносчика лекарственных средств. Макрофаги узнают лизосомы с помощью белков-опсонинов, таких как, бета-2-гликопротеин, бета-2-макроглобулин, С-реактивный белок, фибронектин, иммуноглобулины и др. [1, 14]. Кроме мононуклеарной, разрушение лизосом, циркулирующих в крови вызывает также система комплемента [8, 11]. В случае действия факторов системы комплемента, происходит лизис лизосом и, как следствие, высвобождение препарата непосредственно в кровь, т.е. получается именно тот эффект, которого старались избежать. В настоящее время открыты вещества, называемые дизопсонидами, которые снижают фагоцитарную активность. В частности, имеет значение концентрация плазменного альбумина и иммуноглобулина А для снижения узнавания и разрушения липосом.

Изучение возможности снижения узнавания и разрушения лизосом является одним из перспективных направлений, а такие “липосомы-невидимки” названы “stealth liposomes” [17].

Следующим недостатком использования липосом в качестве контейнера лекарственных препаратов оказалась неустойчивость структуры, вызванная взаимодействием липопротеинов низкой и высокой плотности, что также приводило к истечению содержимого в кровь [2]. С целью ограничения этого недостатка были проведены исследования влияния различных факторов, таких как заряд мембраны, размер, сборка липидного бислоя и его состав, степень текучести и деформируемости везикул на стабильность липосом [13, 3]. Было установлено, что липосомы, содержащие в своем составе сфингомиелин или фосфатидилхолин с цепями насыщенных жирных кислот более стабильны, чем те, в состав которых входят ненасыщенные жирные кислоты [7, 16]. Если сравнивать размеры, то крупные липосомы, мультиламеллярные, элиминируются из циркуляции гораздо быстрее, чем маленькие, униламеллярные. Отрицательно заряженные липосомы имели более низкий период циркуляции по сравнению с нейтрально заряженными везикулами. Липосомы, несущие положительный заряд оказались токсичными и также быстро удалялись из циркуляции системой комплемента. С целью снижения разрушения липосом мононуклеарами и системой комплемента были использованы попытки создания эритроцитоподобных липосом, содержащих в составе мембраны ганглиозиды и дериваты сиаловой кислоты, такие как моносиалоганглиозид. Для повышения гидрофильности были предложены липофильные полимеры. Концепция “липосом-невидимок” интенсивно обсуждалась, было выдвинуто предположение, что наличие подвижных свободных цепей гидрофильных полимеров или гликолипидов на поверхности липосом создает так называемый прелипосомный слой, который предотвращает взаимодействие с другими макромолекулами, в частности опсонинами, и соответственно, уменьшает разрушение липосом мононуклеарами. В связи с уменьшением поглощения и разрушения липосом фагоцитами, они могли достаточно время циркулировать и накапливаться внутри органов и тканей. Этот феномен был назван пассивным нацеливанием/позиционированием, т.к. липосомы аккумулировались в солидных опухолях [4, 15, 17]. Наиболее многочисленными в настоящее время являются разработки использования липосом в онкологии, но перспективным можно считать использование липосомальных препаратов и в ряде другой патологии [17, 8, 10].

Цель работы: установить характер влияния нанопрепарата липосом на состояние оксидативного

стресса, активность антиоксидантной системы в субклеточных фракциях (лизосомы и митохондрии) сердца, печени, почек в динамике синдрома длительного раздавливания (СДР). Дать теоретическое обоснование целесообразности использования липосом для коррекции нарушений липидной пероксидации и снижения летальности при СДР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на 1831 белых крысах-самцах массой 150-220 г, находившихся на стандартном пищевом рационе и обычном температурном режиме вивария. Контрольные и основные опыты ставили одновременно, учитывая суточные и сезонные колебания биоритмов. СДР моделировали раздавливанием мягких тканей задних конечностей крыс в течение 4-х часов в станках с манометрическим контролем силы раздавливания. Этот вид травмы актуален для Донбасса и других промышленных и сейсмически неблагоприятных регионов. Компрессия мягких тканей задних конечностей крыс силой 6 кг/см² на поверхности 12 см² в течение 4-х часов при постоянном регулировании силы давления вызывает полный комплекс морфофункциональных изменений, характерных для СДР тяжелой степени с летальностью 75-80 %, что является типовым патологическим процессом. С целью определения выживаемости животных при данном виде моделирования травматического шока на фоне введения препарата фосфатидилхолиновых липосом нами поставлен эксперимент на 2-х группах животных. Животным первой группы вводили препарат липосом в дозе 10 мг на 100 г живого веса в момент снятия пресса. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем изотонического раствора хлорида натрия. Контроль за выживаемостью проводили в течение 5 суток после устранения компрессии. Для исследования отбирали пробы ткани сердца, печени, почек с немедленным погружением их в жидкий азот, в дальнейшем ткани гомогенизировали. Для оценки состояния ПОЛ и АОС изучали диеновые конъюгаты ненасыщенных жирных кислот, уровень малонового диальдегида, содержание природного антиоксиданта альфа-токоферола, активность супероксиддисмутазы. С целью коррекции выявленных морфо-биохимических нарушений при экспериментальном СДР нами был применен препарат липосом. Фосфатидилхолиновые липосомы получены в лаборатории академика А. В. Стефанова Института биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины. По международной классификации стандартизированы как LUV-большие унिलамеллярные везикулы. В наших исследованиях использованы липосомы, полученные методом "обращения фаз". С помощью ультразвука получают эмульсию типа вода-масло,

используя раствор липидов в органическом растворителе и водную фазу. Затем растворитель удаляют в вакууме, и в результате образуются большие однослойные липосомы размером 0,2-0,8 мкм и с объемом водной фазы 10-12 мкл на 1 мкмоль липидов. Способ считается простым, пригоден для осуществления в укрупненных масштабах и в стерильном исполнении. Доза препарата разработана в лаборатории Института фармакологии и токсикологии НАМН Украины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые при механической травме установлены межсистемные нарушения метаболизма процессов липидной пероксидации на субклеточном уровне в различных шоковых органах (сердце, печень, почки) в динамике СДР. Пусковым механизмом травматической болезни при СДР являются мембранодеструктивные процессы, возникающие вследствие чрезмерной активации перекисления липидов в различных органах. В условиях гипоксии, ацидоза и токсемии, сопровождающих СДР, разбалансируются механизмы метаболической регуляции восстановления кислорода, что делает невозможным его безопасную утилизацию, в связи с чем неиспользованная доля кислорода идет на неконтролируемую активацию процессов перекисного окисления липидов.

Анализ результатов исследования показал, что при СДР в субклеточных фракциях нетравмированных тканей вследствие развития антиоксидантной недостаточности резко активируются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Преимущественного повреждения митохондрий или лизосом выявить не удалось, но количественная характеристика этих нарушений носила разноплановый характер в различных органах. Рост показателей ПОЛ находился в обратной зависимости от изменений антиоксидантной активности, что подтверждает регулируемую роль антиоксидантной системы (АОС) в развитии метаболических нарушений оксидативного стресса при СДР.

В динамике СДР (4 часа компрессии, 2 и 24 часа декомпрессии) отмечена однонаправленная тенденция сдвигов параметров процессов пероксидации, проявляющаяся прогрессированием свободнорадикальных реакций. Повысившись в период компрессии, уровень продуктов ПОЛ спустя 2 часа декомпрессии практически не менялся, что, очевидно, связано с напряженностью АОС, обладающей способностью связывать продукты ПОЛ, образуя малоактивные соединения.

Характер выявленных изменений АОС не смог обеспечить стационарно низкий уровень течения оксидативного стресса. Все это обусловило глубину функциональных нарушений различных органов, что

спустя 24 часа декомпрессии привело к значительному снижению содержания альфа-токоферола и активности СОД в их субклеточных фракциях. Выявленное угнетение активности АОС и рост уровня реакций ПОЛ явились одной из основных причин нарушения структурно-функциональной целостности и повышения проницаемости внутриклеточных мембран. Таким образом, полиораганная недостаточность при СДР имеет особые акценты повреждения, лежащие в основе развития сердечной и почечной недостаточности.

Проявления синдрома перекисидации при СДР, установленные нами на патохимическом уровне, подтверждаются результатами морфологических исследований структуры сердца, печени и почек. Во всех изучаемых тканях отмечались выраженные расстройства микроциркуляции (признаки внутрисосудистого свертывания, венозный застой, повышение проницаемости стенки капилляров и т.д.) и дистрофические изменения (белковая и жировая дистрофии). Деструктивные изменения в тканях изучаемых органов появлялись уже в период компрессии и прогрессивно нарастали спустя 2 и 24 часа декомпрессии. На субклеточном уровне это проявилось активизацией лизосом, набуханием митохондрий с разрушением их крист, признаками повреждения мембраны клетки и субклеточных образований. Установленные морфо-биохимические нарушения различных органов на тканевом и субклеточном уровне прогностически неблагоприятны.

Полученные нами данные по снижению летальности экспериментальных животных под влиянием инфузии липосом при СДР предоставили нам возможность провести ряд биохимических и морфологических исследований для обоснования лечебного эффекта липосом при механической травме в эксперименте. Липосомы способствовали нормализации процессов ПОЛ и увеличению активности АОС в субклеточных фракциях сердца, печени и почек.

Результатами проведенных исследований установлено, что при СДР введение липосом снизило активность перекисного окисления липидов и повысило антиоксидантный статус организма. Накопление продуктов ПОЛ, наиболее выраженное в сердце и почках, больше истощает и их антиоксидантные резервы, что приводит к свободнорадикальным повреждениям этих органов. Введение липосом уже к 2 часам декомпрессии увеличивало, а к 24 часам нормализовало уровень антиоксидантов, направленных на связывание радикалов и продуктов ПОЛ или образование малоактивных соединений с последующим их выведением из организма. Подобный эффект объясняется адсорбцией на липосомах

возникающего при СДР избытка токсических продуктов ПОЛ с быстрым их переносом к цитохромзависимой системе оксигеназ, способных обезвреживать дериваты ПОЛ. Очевидно, имеет значение также временная блокада на поверхности липосом избытка продуктов ПОЛ с постепенным их высвобождением, что может смягчить токсический удар продуктов ПОЛ и позволить печени использовать возможности системы обезвреживания.

После введения липосом микроскопическая картина печени изменилась. Центролобулярные некрозы были меньше по площади и встречались лишь в отдельных дольках. При ультраструктурном исследовании выявлено, что эндотелий синусоидов поврежден в меньшей степени, в гепатоцитах значительно меньше контактов лизосом с митохондриями, наружная мембрана митохондрий оставалась целой. В кардиомиоцитах менее выражены деструктивные процессы и лизис ядер и саркоплазмы, уменьшились повреждения клеточной мембраны. В почках в отдельных клетках канальцевого эпителия наблюдались признаки регенерации - активация ядерного аппарата, гиперплазия митохондрий. В строме канальцев почек отмечалась активация местных иммунных клеточных реакций: наличие значительного количества т-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и плазматических клеток.

ВЫВОДЫ

1. 4-х часовая компрессия мягких тканей задних конечностей лабораторных животных сопровождается развитием в субклеточных фракциях различных органов (сердце, печени, почках) мембранодеструктивных процессов, одним из пусковых механизмов которых является чрезмерная активация перекисного окисления липидов (накопление ДК НЖК, МДА), протекающая на фоне снижения активности антиоксидантной системы (альфа-токоферола, СОД). Степень свободнорадикальных повреждений различных органов нарастает в динамике СДР: спустя 2 и 24 часа декомпрессии прогрессивно увеличивается интенсивность оксидативного стресса и уменьшается активность антиоксидантной системы.

2. Морфологические – тканевые (дистрофические и дисциркулярные) и ультраструктурные (нарушение целостности и повышение проницаемости клеточных и субклеточных мембран) изменения в изучаемых органах связаны с избыточной активацией ПОЛ. Процессы перекисидации с одинаковой интенсивностью протекают и в митохондриях, и в лизосомах, степень повреждения субклеточных фракций зависит от самого органа. В большей степени повреждаются сердце и почки, т.к. они являются «шоковыми органами».

3. Снижение антиоксидантной обеспеченности организма наряду с интенсификацией процессов ПОЛ является прогностически неблагоприятным фактором в развитии СДР. Летальность лабораторных животных составляет 84%. Введение липосом при СДР оказывает значительное лечебное действие, снижая летальность до 4 %.

4. Инфузия липосом при СДР приводит к нормализации содержания продуктов ПОЛ, росту антиоксидантной обеспеченности организма.

5. По данным световой и электронной микроскопии введение липосом при СДР в значительной степени ограничивает мембранодеструктивные процессы, улучшает состояние микроциркуляторного русла, снижает степень дистрофических повреждений в изучаемых органах.

6. Установленная антиоксидантная роль нанопрепарата липосом в системе биохимической защиты клетки от повреждающего действия свободных радикалов и продуктов ПОЛ при СДР, дает возможность рекомендовать липосомы для клинической апробации с целью включения в комплексную патогенетическую терапию СДР.

Заключение. Таким образом, инфузия нанопрепарата липосом при СДР привела к нормализации процессов ПОЛ, росту биоантиоксидантной активности, чем способствовала стабилизации клеточных и субклеточных мембран, т.е. вызвала значительный защитный эффект, увеличив при этом выживаемость животных до 96 %. Нами впервые установлена способность липосом связывать продукты ПОЛ, снижая их содержание и повышая активность АОС в сердце, печени, почках на внутриклеточном уровне, что приводило к увеличению резистентности тканей к травме. Установление антиоксидантной роли липосом в системе биохимической защите клетки от повреждающего действия свободных радикалов и продуктов ПОЛ при СДР позволяют рекомендовать включение липосом в комплексную патогенетическую терапию СДР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атруз О. М. Взаимодействие альвеолярных макрофагов больных и здоровых людей с липосомами / О. М. Атруз, А. А. Селищев, Г. М. Сорокоумова // Бюллетень эксп. биол. и медицины. – 1997. – Т. 124, № 11. – С. 520-523.
2. Галицька С.М. Біологічні властивості ліпосом та їх практичне використання / С. М. Галицька // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 99-108.
3. Григор'єва Г.С. Ліпосомофармакологія / Г.С. Григор'єва // Фарм. та лікар. токсикологія. – 2008. – № 4. – С.83-88.
4. Кулак Г.И. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину / Г.И. Кулак, В.М. Пивнюк, М.М. Носко [и др.] // Онкология. – 2009. – № 1. – С. 76-80.
5. Чекман І.І. Ліпосомальні форми лікарських засобів: від експерименту до клініки / І. І. Чекман, Л.В. Савченкова, І.О. Горчакова // Журн. АМН України. – 2006. – Т. 12, № 4. – С.653-657.
6. Чекман І.С. Нанофармакологія / І.С. Чекман. – К.: Задруга, 2011. – 424 с.
7. Шве́ц В.И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии / В.И. Шве́ц, Ю.М. Краснопольский // Провизор. – 2008. - № 3. – С. 18-24.
8. Шепетько М.В. Парадоксальне поєднання ефектів ліпосом і посилення катехоламінової вазоконстрикції та гіпотензивна дія / М.В. Шепетько, А.І. Соловйов // Мед перспективи. – 2009. – Т.14, № 2. – С. 29-35.
9. Adams G.P. Monoclonal antibody therapy of cancer / GP Adams, LM.Weiner // Nat. Biotechnol. – 2005. – Vol. 23. – P.1147-1157.
10. Asai M, Oku N. Liposomalized oligopeptides in cancer therapy // Methods Enzymol. – 2005. – No. 391. – P. 163–176.
11. Gascon AR, Pedraz JL. Cationic lipids as gene transfer agents: a patent review // Expert Opin Ther Pat. – 2008. – No. 18. – P. 515–524.
12. Karmali PP, Chaudhuri A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises // Med Res Rev. – 2007. – No. 27. – P. 696–722.
13. Mahato RI. Water insoluble and soluble lipids for gene delivery // Adv Drug Deliv Rev. – 2005. – No. 57. – P. 699–712.
14. Ramezani M, Khoshhamdam M, Dehshahri A, Malaekheh-Nikouei B. The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes // ColloidsSurf B. – 2009. – No. 72. – P. 1–5.
15. Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin: optimizing the dosing schedule in ovarian cancer // Oncologist. – 2005. – No. 10. – P. 205–214.
16. Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, et al. Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study // Oncol Rep. – 2005. – No. 13. – P. 589–595.
17. Zamboni WC, Ramalingam S, Friedland DM, et al. Phase I and pharmacokinetic (PK) study of STEALTH liposomal CKD-602 (S-CKD602) in patients with advanced solid tumors // J Clin Oncol (Meeting Abstracts). – 2005. – No. 23. – P. 2069.