

ВЛИЯНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ЛИПОСОМ НА СКОРОСТЬ ВЫХОДА ЗАКЛЮЧЕННЫХ В НИХ АДРЕНОМИМЕТИКОВ

Липосомы — искусственные везикулы, представляющие собой мембранные структуры, образованные при набухании фосфолипидов в водных растворах [8]. В многочисленных работах описаны попытки применения липосом для введения в организм различных лекарственных веществ [3]. Липосомы защищают заключенные в них препараты от быстрого разрушения в организме, увеличивают время их циркуляции в кровотоке.

Липидный состав мембраны липосом, их заряд оказывают большое влияние на стабильность липосомальных препаратов лекарственных веществ в кровотоке, разрушение их разными компонентами крови, скорость выведения из кровеносного русла, возможное взаимодействие с клеточными мембранами [9, 11—13].

Адренергические соединения, которые мы исследовали, быстро инактивируются в организме с помощью различных механизмов [1]. Внутривенное их введение животным в составе липосом пролонгирует их действие на сердечно-сосудистую систему [2, 5, 6]. В настоящей работе исследовали влияние состава мембраны липосом на продолжительность действия липосомальных препаратов адреномиметиков.

Методика

Для приготовления липосом использовали яичный лецитин, полученный по ранее описанному методу [8], дицетилфосфат, холестерин, стеариламин фирмы «Serva», а также следующие адреномиметики: L-норадреналин гидрохлорид и адреналин фирмы «Koch-Light», изопропилнорадреналин фирмы «Serva», ^3H -адреналин гидрохлорид Все-союзного объединения «Изотоп», фенилэфрин (мезатон) — фармакологический препарат.

Раствор липидов в хлороформе помещали в круглодонную колбу, высушивали на вакуумном роторном испарителе, добавляли раствор изучаемого адреномиметика (от 20 до 200 мкг в 1 мл раствора NaCl концентрацией 17 ммоль/л, подкисленный до pH 3,0), встряхивали 30—40 мин, затем «озвучивали» на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 в течение 2—4 мин при 22 кГц. Невключившиеся вещества отделяли от липосом гель-фильтрацией на сефадексе G-75. Для определения общего относительного количества адреномиметиков, связавшихся с липосомами, к 200—500 мкл раствора липосом добавляли 3 мл 70 %-ного этилового спирта и с помощью калибровочной кривой определяли концентрацию изучаемого адреномиметика по его поглощению при длине световой волны 280 нм. В качестве контроля использовали липосомы, полученные без добавления адреномиметика. Препарат липосом содержал 5—10 мкг липида и 400—800 мкг адреномиметика в 1 мл. Для определения возможного связывания адреномиметиков с поверхностной мембраной получали «пустые» липосомы (без адреномиметика), затем добавляли к ним исследуемое вещество и сразу наносили на колонку с сефадексом. Липосомы находились в контакте с адреномиметиком не более 1 мин. Относительное количество связавшегося с мембраной адреномиметика определяли по описанной выше методике.

Выход адреномиметиков из липосом изучали с помощью метода последовательного диализа против 0,9 %-ного NaCl (соотношение объемов — 1:10) в диализных мешочках марки Visking tube 8/32 при 37 °C [2].

Для исследования влияния плазмы крови на скорость выхода адреномиметиков из липосом разного состава использовали липосомы, содержащие ^3H -адреналин (при формировании липосом к раствору адреналина в NaCl концентрацией 17 ммоль/л, добавляли ^3H -адреналин гидрохлорид). Плазму крови (донорской) инкубировали с липосомами (соотношение по объему 1:1) при 37 °C. Липосомы отделяли от плазмы хроматографией на ультрагеле Аса-34 фирмы «LKB» и радиометрировали на сцинтиляционном счетчике.

Для исследования физиологического действия препаратов липосом кошкам (25 животным) внутривенно вводили хлоралозно-уретановую наркотическую смесь (по 50 и 500 мг/кг соответственно), выделяли у них бедренную вену для введения исследуемых веществ и бедренную артерию, через которую в аорту вводили катетер для регистрации системного артериального давления. Затем производили трахеостомию и животных переводили на искусственное дыхание. В опытах регистрировали системное артериальное давление и частоту сердечных сокращений. Регистрацию всех показателей проводили на многоканальном самописце Н-338 6П. Изучаемые параметры записывали в покое и на пике реакции. За длительность реакции принимали время от момента введения препарата до возвращения регистрируемых показателей к исходному значению.

Выведение липосом из кровотока также изучали в острых опытах на крысах (300—400 г) под хлоралозно-уретановым наркозом. У животных выделяли подключичную вену и сонную артерию, производили трахеостомию. Препарат липосом вводили в подключичную вену, кровь отбирали из сонной артерии. Мембрану липосом метили с помощью ^{14}C -холестерина. Для этого в раствор исходных липидов в хлороформе добавляли ^{14}C -холестерин (Всесоюзное объединение «Изотоп»). Для обеспечения условий гомотогенного счета радиоактивности пробы крови специально обрабатывали: 50 мкл крови смешивали со 100 мкл гиамина (Hyamine hydroxide, 10X, фирма «Inter-technique»), выдерживали 1 ч при 60°C в герметично закрытых сцинтилляционных флаконах, добавляли 200 мкл изопропилового спирта (или 1 мл толуола), 500 мкл 30 %-ного раствора перекиси водорода, снова выдерживали 1 ч при 60°C , охлаждали и добавляли 15 мл сцинтилляционной жидкости, состав которой описан в другой работе [10].

Счет использованных радиоактивных образцов (с ^3H -адреналином и ^{14}C -холестерином) проводили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике Rack Beta фирмы «LKB» по специально построенным калибровочным графикам, которые учитывают возможное переменное гашение проб.

Результаты

Для изучения влияния состава липосом на действие заключенных в них адреномиметиков использовали следующие (по количеству вещества, моль) смеси липидов, входящих в состав липосом: 9:1; 1:1 (лецитин—холестерин) — липосомы с разным содержанием холестерина; 9:1:1; 1,2:1:1 (лецитин — холестерин—дицетилфосфат), 9:1:1 (лецитин—холестерин—фосфатидилсерин) — отрицательно заряженные липосомы; 9:1:1 (лецитин—холестерин—стеариламин) — положительно заряженные липосомы.

При приготовлении липосом определяли возможную сорбцию адреномиметиков на поверхности мембраны липосом и общее относительное количество вещества, связанного с липосомами. Так, последний показатель в липосомах состава 9:1 (лецитин—холестерин) составил для норадреналина — $4,2\% \pm 1,12\%$, фенилэфрина — $1,76\% \pm 0,35\%$, адреналина — $2,70\% \pm 0,23\%$, изопропилнорадреналина — $2,0\% \pm 0,65\%$ исходного их количества.

Результаты опытов, в которых липосомы находились в контакте с адреномиметиком короткое время, показали, что часть общего количества связанных с липосомами веществ, вероятно, сорбировалась на поверхности липосомальной мембраны: норадреналина — $11,20\% \pm 1,90\%$, фенилэфрина — $27,70\% \pm 6,40\%$, адреналина — $13,10\% \pm 5,60\%$, изопропилнорадреналина $15,20\% \pm 1,20\%$ (данные для липосом того же состава, % связанного).

В зависимости от молярного соотношения и состава липидов мембраны количество (% исходного) связанного с липосомами адреномиметика несколько изменялось:

9:1 (лецитин—холестерин)	$1,76 \pm 0,35$
9:1:1 (лецитин—холестерин—стеариламин)	$1,30 \pm 0,40$
9:1:1 (лецитин—холестерин — дицетилфосфат)	$3,10 \pm 0,45$
9:1:1 (лецитин—холестерин—фосфатидилсерин)	$1,90 \pm 0,70$

Используя метод последовательного диализа, мы изучали скорость выхода адреномиметиков из липосом. На рис. 1 представлен график влияния липидного состава липосом на скорость выхода адреналина и фенилэфрина. Как видно, введение в мембрану липосом 50 % (молярная доля) холестерина уменьшает скорость выхода адреномиметиков из липосом. Из положительно заряженных липосом фенилэфрин выходит

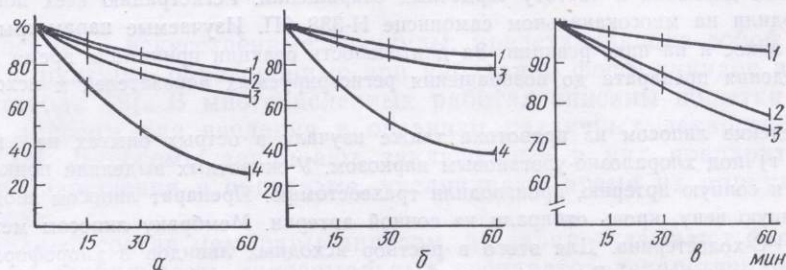


Рис. 1. Выход (%) адреномиметиков из липосом разного состава (моль): 1—1:1 (лецитин — холестерин); 2—9:1:1 (лецитин — холестерин — дицетилфосфат); 3—9:1 (лецитин — холестерин); 4—9:1:1 (лецитин — холестерин — стеариламин): а, в — общий выход связанных с липосомами фенилэфрина и адреналина; б — выход фенилэфрина (без сорбированного на мембране).

с высокой скоростью. Различные адреномиметики имели разную скорость выхода из липосом одного состава. Так, за 60 мин из липосом количественного состава 9:1 (лецитин — холестерин) выходило: $26,6\% \pm 1,2\%$ — адреналина, $24,4\% \pm 0,4\%$ — норадреналина, $19,2\% \pm 2,9\%$ — изопропилнорадреналина, $35,0\% \pm 1,2\%$ — фенилэфрина. Липосомы, содержавшие адреномиметики, связанные с наружной мембраной, диализировали в аналогичных условиях. Результаты этих опытов использованы при построении графиков,

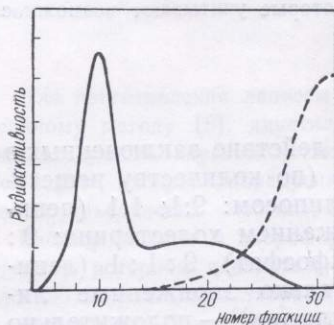


Рис. 2. Гель-фильтрация (на ультрагеле АсА—34) липосом, содержащих ^3H -адреналин, и плазмы крови, инкубированной в растворе ^3H -адреналина. Пунктир — выход плазмы из колонки.

отражающих выход из липосом вещества, заключенного только во внутренней полости (см. рис. 1, б).

Из всех приведенных данных следует, что фенилэфрин имеет большую скорость выхода из липосом разного липидного состава, по сравнению с другими адреномиметиками, и больше других сорбируется на их поверхности.

Известно, что при введении липосом в кровеносное русло, проницаемость их мембран значительно изменяется [3]. Мы исследовали влияние плазмы крови на скорость выхода ^3H -адреналина из липосом разного состава в опытах *in vitro*. Как уже указывалось, липосомы инкубировали с плазмой крови, а затем разделяли на колонке с ультрагелем АсА-34. Предварительно были поставлены опыты, в которых проверяли полноту разделения на колонке с ультрагелем смеси липосом и плазмы крови (рис. 2). Для этого через колонку отдельно пропускали липосомы, содержащие ^3H -адреналин, и плазму крови, предварительно инкубированную в растворе ^3H -адреналина. Выход плазмы контролировали по радиоактивности трития и поглощению ее белков при 280 нм.

Как показали результаты наших исследований, радиоактивная метка начинает выходить с первыми после свободного объема фракциями белков плазмы, что свидетельствует о связывании ^3H -адреналина с белками плазмы крови. Поэтому для исследования влияния плазмы крови на выход адреналина из липосом использовали липосомы 8—12-й

фракции (см. рис. 2), которые выходили со свободным объемом колонки. Как видно из рис. 3 плазма крови значительно увеличивает скорость выхода ^3H -адреналина из липосом состава 9:1 (лецитин—холестерин), и 9:1:1 (лецитин—холестерин—дицетилфосфат). Плазма крови незначительно влияет на выход адреналина из липосом состава 1:1 (лецитин—холестерин). Добавка в такие липосомы дицетилфосфата несколько повышает скорость выхода адреналина под действием плазмы крови.

Длительность действия адреномиметиков, заключенных в липосомы, зависит также от скорости выведения липосом из кровеносного

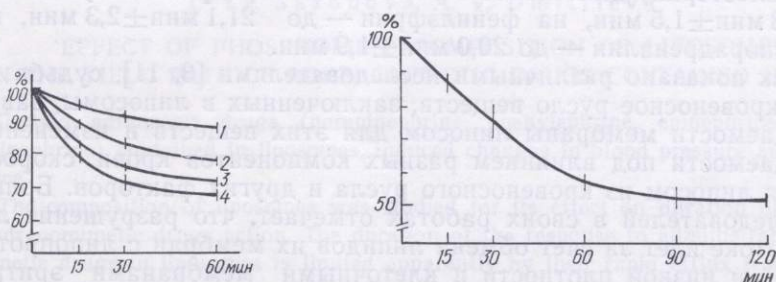


Рис. 3. Влияние плазмы крови на выход (%) адреналина из липосом разного состава (моль): 1—1:1 (лецитин — холестерин); 2—1,2:1:1 (лецитин — холестерин — дицетилфосфат); 3—9:1:1 (лецитин — холестерин — дицетилфосфат); 4—9:1 (лецитин — холестерин).

Рис. 4. Динамика выхода (%) липосом (состав 9:1; лецитин — холестерин, моль) меченных ^{14}C -холестерином, из кровеносного русла.

русла. Результаты опытов по изучению скорости выведения из кровотока липосом, меченных ^{14}C -холестерином, представлены на рис. 4. ^{14}C -холестерин, введенный в мембрану липосом, как это отмечали и другие исследователи [12], имел две фазы выведения: быструю и медленную. Через 60 мин в кровотоке оставалась половина введенной метки (быстрая фаза), а затем в течение 1,5 ч скорость выведения оставшейся метки заметно не изменялась (медленная фаза).

Результаты проведенных нами исследований по изучению влияния состава мембраны липосом на длительность реакции сердечно-сосудистой системы, вызванной введенными в липосомах адреномиметиками, показали, что увеличение в мембране липосом холестерина до 50 % (молярная доля), а также введение в их мембрану отрицательно заряженных липидов (дицетилфосфата и фосфатидилсерина) удлиняло действие заключенных в них адреномиметиков: адреналина, изопропилнорадреналина — до 20—25 мин, фенилэфрина — до 30—45. Увеличение в мембране отрицательно заряженных липосом содержания холестерина дополнительного эффекта не вызвало.

Следует отметить, что реакция на введение в липосомах разного состава фенилэфрина была более длительной, чем на другие адреномиметики. Положительно заряженные липосомы состава 9:1:1 (лецитин—холестерин—стеариламин) использовали только для введения в них фенилэфрина. Результаты показали, что длительность реакции на связанные адреномиметики почти не превышала длительность, полученную при введении свободного фенилэфрина.

Обсуждение результатов

Как указывалось ранее [2, 4, 5—7], введение заключенных в липосомы различных адреномиметиков, в кровеносное русло животных вызывало пролонгирование их действия на сердечно-сосудистую систему. Липосомные препараты адреномиметиков вводили внутривенно кошкам. Доза вводимых препаратов, содержащих адреналин составляла

60 мкг/кг, фенилэфрина — 200, изопропилнорадреналина — 20. Дозы подобраны в результате изучения зависимости доза — эффект. Оптимальными считали те из них, повышение которых не способствовало увеличению продолжительности действия препаратов. Мы ранее описывали особенности действия липосомальных препаратов изучаемых адреномиметиков на кардиогемодинамику животных [2, 5, 6]. Согласно этим данным длительность реакции на введение свободных адреномиметиков составила $3,8 \text{ мин} \pm 0,36 \text{ мин}$ для норадреналина, $11,4 \text{ мин} \pm 1,0 \text{ мин}$ для фенилэфрина, $6,5 \text{ мин} \pm 0,5 \text{ мин}$ для изопропилнорадреналина. При введении адреномиметиков в липосомах состава 9:1 (лецитин—холестерин) длительность реакции на норадреналин увеличивалась до $17,8 \text{ мин} \pm 1,5 \text{ мин}$, на фенилэфрин — до $21,1 \text{ мин} \pm 2,3 \text{ мин}$, на изопропилнорадреналин — до $20,0 \text{ мин} \pm 1,9 \text{ мин}$.

Как показано различными исследователями [3, 11], судьба введенных в кровеносное русло веществ, заключенных в липосомы, зависит от проницаемости мембраны липосом для этих веществ и изменения этой проницаемости под влиянием разных компонентов крови, скорости выведения липосом из кровеносного русла и других факторов. Большинство исследователей в своих работах отмечает, что разрушение липосом в кровотоке идет за счет обмена липидов их мембран с липопротеидами высокой и низкой плотности и клеточными мембранами эритроцитов [3], а также взаимодействия различных белков крови с мембранами липосом [11].

Полученные нами данные показали, что липосомальные мембраны значительно проницаемы для адреномиметиков (см. рис. 1). Скорость выхода адреномиметиков из липосом зависит от липидного состава их мембраны и природы адреномиметика. Введение в мембрану липосом холестерина уменьшает выход исследуемых веществ в условиях диализа. Значительную скорость выхода фенилэфрина из положительно заряженных липосом можно объяснить электростатическим взаимодействием его с мембраной липосом [3], так как в наших опытах адреномиметик был, вероятно, представлен катионной формой.

Известно, что введенный в мембрану липосом холестерин оказывает конденсирующее действие на структуру бислоя мембран, уменьшает его проницаемость и выход заключенных в липосомы веществ при введении в кровоток [9, 13]. В наших опытах увеличение содержания холестерина в липосомах до 50 % (молярная доля) также уменьшает скорость выхода адреномиметиков из липосом (см. рис. 3) и, следовательно, может удлинять эффект таких препаратов.

Скорость выведения липосом из кровотока зависит от размера липосом и их заряда [9]. По данным электронно-микроскопических исследований (метод негативного контрастирования) использованные в наших опытах липосомы имели в основном мультислойную структуру и были гетерогенны по размеру. Средний размер липосом — $115 \text{ нм} \pm 35 \text{ нм}$. Известно, что такие липосомы более стойки к действию крови благодаря наличию нескольких концентрических слоев мембраны, но довольно быстро выводятся из кровотока [3].

Влияние заряда на скорость выведения липосом из кровотока отмечается многими исследователями, но эти данные противоречивы [3, 9]. Как показали результаты наших исследований, адреномиметики, заключенные в отрицательно заряженные липосомы, вызывали наиболее длительные реакции сердечно-сосудистой системы, в то время как плазма крови, инкубированная с такими липосомами, значительно увеличивала скорость выхода исследуемых веществ из липосом (см. рис. 3). Возможно, что в наших опытах липосомы с отрицательным зарядом несколько медленнее выводятся из кровотока, как было отмечено и другими авторами [3]. Заряд мембраны также может иметь значение при взаимодействии липосом с клеточными мембранами, определенными белками в плазме крови и приобретении липосомами новых качеств [11].

Большой эффект препаратов липосом с фенилэфрином объясняется, очевидно, свойствами самого миметика. Фенилэфрин отличается от

сутствием одной гидроксильной группы в бензольном кольце и вследствие этого скорость его инактивации в организме меньше [1].

Таким образом, длительность действия введенных в составе липосом адреномиметиков в наших опытах лимитируется быстрым их выходом из липосом и, вероятно, значительной скоростью выведения из кровотока. Эффективность липосомальных препаратов зависит от липидного состава мембран липосом. Введение в них холестерина (30—50 %, молярная доля) и отрицательно заряженных липидов удлиняет срок действия исследуемых веществ.

L. Ya. Sazonova, A. V. Dmitrieva

EFFECT OF PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF LIPOSOMES ON THE YIELD RATE OF ADRENOMIMETIC DRUGS CONTAINED IN THEM

Certain adrenergic drugs (norepinephrine, phenylephrine, epinephrine, isopropyl-norepinephrine) contained in liposomes, induced changes in blood pressure and vessel resistance.

The composition of liposomes was studied for its effect on duration of the liposomal adrenomimetic drugs action. The duration of the response to administration of adrenomimetic drugs in liposomes is limited apparently by their rapid efflux from liposomes and by a high rate of liposome transport from the blood channel. Administration of cholesterol (up to 30-50 %, a mole fraction) and a negative charge to liposomes elongated the action of the substances under study.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

1. Авакян О. М. Симпато-адреналовая система. — Л.: Наука, 1974. — 183 с.
2. Дмитриева А. В., Стефанов А. В., Бойко В. И. и др. Кардиостимулирующее действие заключенного в липосомы норадреналина в условиях блокады адренергических рецепторов // Физиол. журн. СССР. — 1983. — 68, № 8. — С. 1023—1030.
3. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса, А. М. Аллисона. — М.: Медицина, 1983. — 384 с.
4. Сазонова Л. Я., Стефанов А. В. Влияние адреномиметиков, заключенных в липосомы, на гемодинамику // Биохимические механизмы регуляции генетической активности: Тез. докл. респ. симпозиум. Канев, май 1984. — Киев, 1984. — С. 178.
5. Стефанов А. В., Дмитриева А. В., Гуревич М. И. и др. Влияние норадреналина, заключенного в липосомы, на кардиогемодинамические показатели в условиях блокады адренергических рецепторов // Докл. АН СССР. — 1983. — 268, № 5. — С. 1270—1273.
6. Стефанов А. В., Дмитриева А. В., Гуревич М. И. и др. Влияние заключенного в липосомы фенилэфрина на кардио- и гемодинамику в условиях блокады адренорецепторов // Физиол. журн. — 1984. — 30, № 2. — С. 185—190.
7. Стефанов А. В., Дмитриева А. В., Бойко В. И., Гуревич М. И. Влияние заключенного в липосомы изопропиленорадреналина на кардиогемодинамику в условиях блокады адренорецепторов // Физиол. журн. СССР. — 1984. — 70, № 4. — С. 456—463.
8. Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G. Preparation and use of liposomes as model of biological membranes // Method Membrane Biol. — 1974. — 1. — P. 1—68.
9. Gregoriadis G., Senior J. The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation // FEBS Letters. — 1980. — 119, N 1. — P. 43—46.
10. Herberg R. G. Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissue. Liquid scintillation counting of tissues // Anal. Chim. — 1960. — 32, N 1. — P. 42—46.
11. Juliano R. L., Lin G. The interaction of plasma proteins with liposomes, protein binding and effects on the clotting and complement systems // Biochim. et biophys. acta. — 1979. — 580, N 1. — P. 137—143.
12. Juliano R. L., Stamp R. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes encapsulated drugs // Biochem. and Biophys. Res. Commun. — 1975. — 63, N 3. — P. 651—654.
13. Kirby C., Clarke J., Gregoriadis G. Effect of cholesterol of small unilamellar liposomes on the stability in vivo and in vitro // Biochem. J. — 1980. — 186, N 2. — P. 591—598.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР,
Киев

Поступила 10.04.85