

УДК: 577.115:616.127-005.8:616-092.9:599.323.4

ДЕПОНИРОВАНИЕ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ VEGF, ПОСЛЕ ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОГО И СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА*Е. А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров, Я. Г. Торопова, Г. В. Лисаченко***LIPOSOMAL VEGF DEPOSITION AFTER INTRAMYOCARDIAL AND SYSTEMIC ADMINISTRATION IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION***E. A. Velikanova, A. S. Golovkin, R. A. Mukhamadiarov, Yu. G. Toropova, G. V. Lisachenko*

Проведена оценка органного распределения липосом разного диаметра, содержащих VEGF, после их системного и интрамиокардиального введения на фоне моделированного инфаркта миокарда. Показано, что при местном введении в область моделированного инфаркта миокарда липосомы задерживаются в миокарде. Липосомы меньшего диаметра поглощаются клетками более интенсивно.

Liposomal VEGF of various diameter were examined for their organ distribution following intramyocardial and systemic administration in a model of myocardial infarction. Liposomes were found to stay in the myocardium after intramyocardial administration. Besides, smaller liposomes were more intensively absorbed by cells. No liposomal deposition in the brain was observed.

Ключевые слова: липосомы, VEGF, инфаркт миокарда.

Keywords: liposomes, VEGF, myocardial infarction.

Введение

Несмотря на достижения медицины и биологии последнего времени, остается актуальной проблема терапии ишемических заболеваний. В том числе значимой является проблема доставки лекарственных веществ к ишемизированным областям. Одним из возможных путей решения этой проблемы является использование липосом в качестве средства доставки, обладающего собственной мембраностабилизирующей активностью.

Известно, что свойства липосом связаны с их физическими характеристиками: размером, составом липидной оболочки, зарядом поверхности [1]. Изменяя эти параметры, можно влиять на степень поглощения липосом различными органами, осуществляя, таким образом, пассивную направленность препарата.

Перспективным направлением в области терапии ишемических повреждений миокарда, в частности инфаркта миокарда, признается использование сосудисто-эндотелиального ростового фактора (VEGF). Являясь основным фактором активации и регуляции ангиогенеза, VEGF успешно применяется в ряде экспериментальных и клинических исследований [2]. Однако непродолжительное время существования фактора роста в кровотоке (15 мин) [8]), а также возможная токсичность в высоких концентрациях [6] ограничивают использования VEGF в терапевтических целях. Известно, что липосомы эффективно сохраняют включенные вещества от разрушения в кровотоке, а также за счет направленной доставки к клеткам позволяют использовать более низкие концентрации ростового фактора.

Поскольку распределение липосом в организме зависит от включенных в их состав веществ [9], необходима оценка органного распределения липосом с VEGF и возможности их использования для направленной доставки к миокарду.

Цель: определить особенности органного распределения липосом различного диаметра, содержащих VEGF после интрамиокардиального и системного введения при моделированном инфаркте миокарда.

Материалы и методы

Липосомы получали методом гидратации липидной пленки с последующей экструзией через поликарбонатные фильтры заданного размера. Изготавливались липосомы диаметром 50 нм и 100 нм. Липидная фаза состояла из лецитина и холестерина в соотношении 7:3. Для визуализации липосом в их состав вводили люминесцентный краситель. Для этого в липидную оболочку включали флуоресцентный краситель РКН2 в молярном соотношении краситель:липид 1:15000. Во внутреннюю фазу включали VEGF в концентрации 5 нг/мл. Липосомы перед применением разводили физиологическим раствором до рабочей концентрации 2,5 мг/мл в пересчете на липиды.

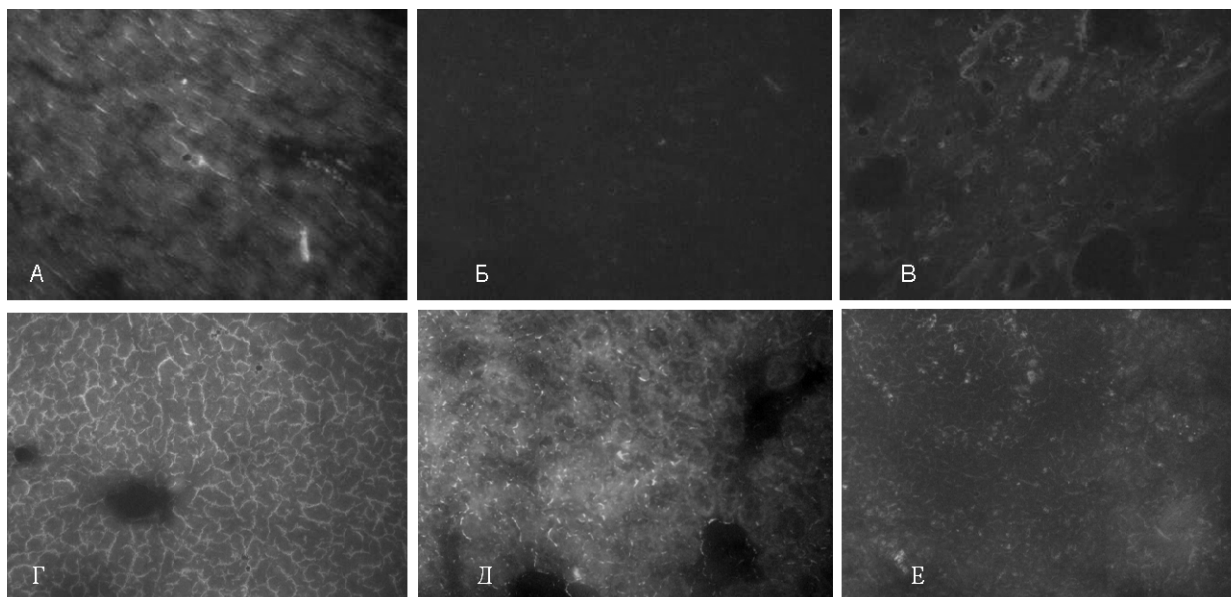
Эксперимент проводили на 30 самцах крыс линии Вистар массой 300 – 350 г. Инфаркт миокарда моделировали лигированием диагональной ветви коронарной артерии.

Липосомы вводили на 3 сутки после операции моделирования инфаркта миокарда. Использовали два варианта введения липосомальных композиций – интрамиокардиальное и системное. При интрамиокардиальном введении на 3 сутки животным проводили повторную операцию и выполняли 3 – 4 местные инъекции липосом в область верхушки сердца вблизи зоны инфаркта. Суммарный объем введённой субстанции составлял 0,5 мл. При системном введении делали инъекцию липосомального препарата аналогичного объема в хвостовую вену. Животных выводили из эксперимента на 3 сутки после повторной операции. Извлекали сердце, легкие, печень, почку, селезенку, головной мозг; замораживали в жидком азоте. Для оценки распределения липосом криостатные срезы органов толщиной 8 мкм анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager.A1.

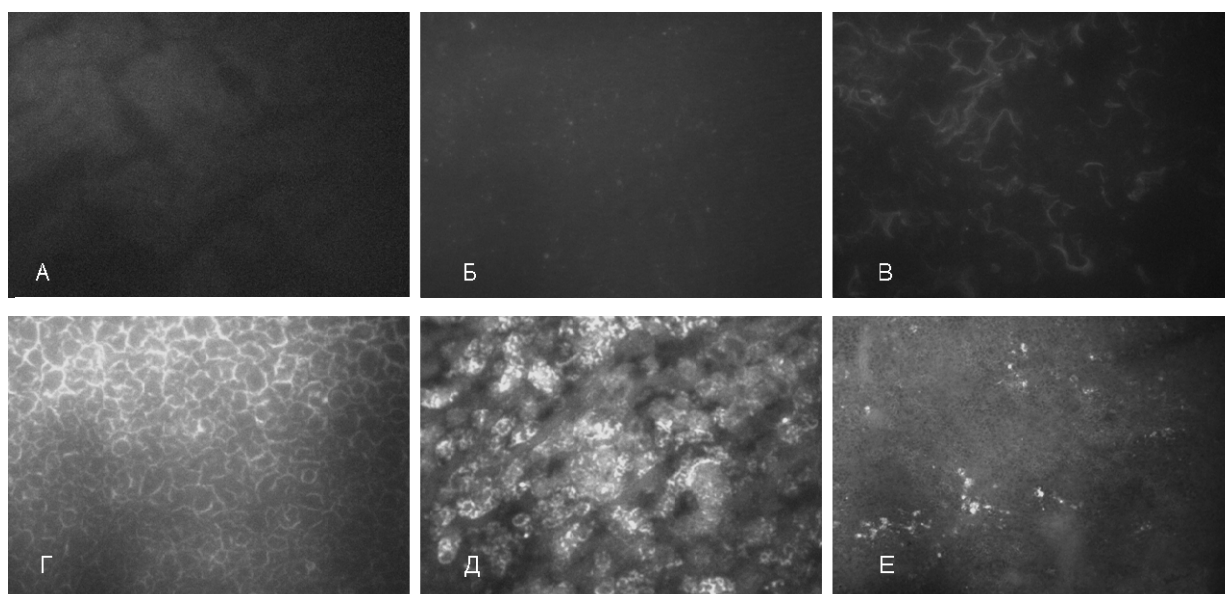
Результаты

На 3 сутки после интрамиокардиального введения липосом диаметром 100 нм свечение флуоресцентной метки сохранялось в миокарде (рис. 1). Наблюдалось выраженное свечение красителя в межклеточном про-

странстве. Также отмечалось окрашивание кардио- миоцитов.



*Рис. 1. Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 100 нм через 3 суток после местного введения. Ув. x200
А – миокард, Б – головной мозг, В – легкие, Г – печень, Д – почка, Е – селезенка*



*Рис. 2. Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 100 нм через 3 суток после системного введения. Ув. x 200
А – миокард, Б – головной мозг, В – легкие, Г – печень, Д – почка, Е – селезенка*

При исследовании других органов после интрамиокардиального введения меченых липосом наиболее выраженная концентрация флуоресцентной метки наблюдалась в печени и в почках. Менее выраженная флуоресценция наблюдалась в селезенке. В легких обнаруживались отдельные включения флуоресцентной метки, прокрашивался преимущественно эндотелий сосудов. В головном мозге свечение метки не отмечалось.

После системного введения липосом диаметром 100 нм их органное распределение несколько отлича-

лось от картины, наблюдавшейся после интрамиокардиального введения (рис. 2). Наибольшая выраженность свечения также наблюдалась в печени, почках, селезенке, однако концентрация метки заметно превышала таковую при местном введении липосом. В легких наблюдались отдельные включения флуоресцентной метки. В головном мозге метка не обнаруживалась. Однако при системном введении липосом не отмечалось содержание метки в миокарде.

Через 3 суток после местного введения липосом диаметром 50 нм в миокарде было замечено свечение

флуоресцентной метки, значительно менее выраженное, чем при введении липосом размером 100 нм (рис. 3). При этом не наблюдалось накопления метки в межклеточном пространстве, окрашивались только

кардиомиоциты. Также флуоресцентная метка обнаруживалась в легких, печени. Свечение большей интенсивности наблюдалось в почках и селезенке.

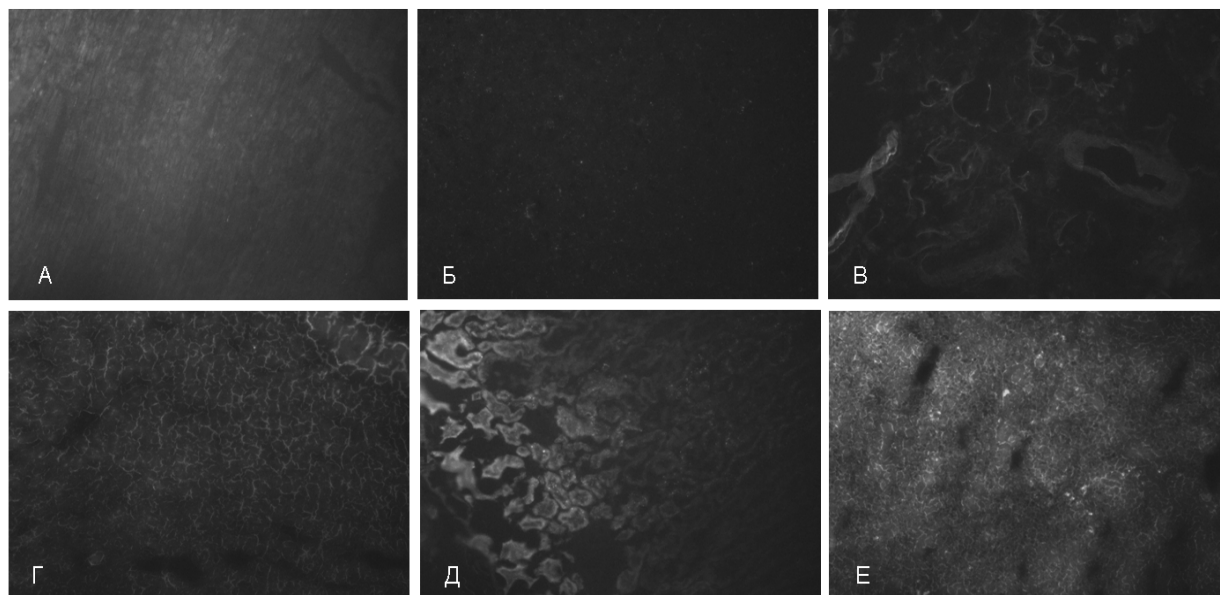


Рис. 3. Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 50 нм через 3 суток после местного введения. Ув. x 200

А – миокард, Б – головной мозг, В – легкие, Г – печень, Д – почка, Е – селезенка

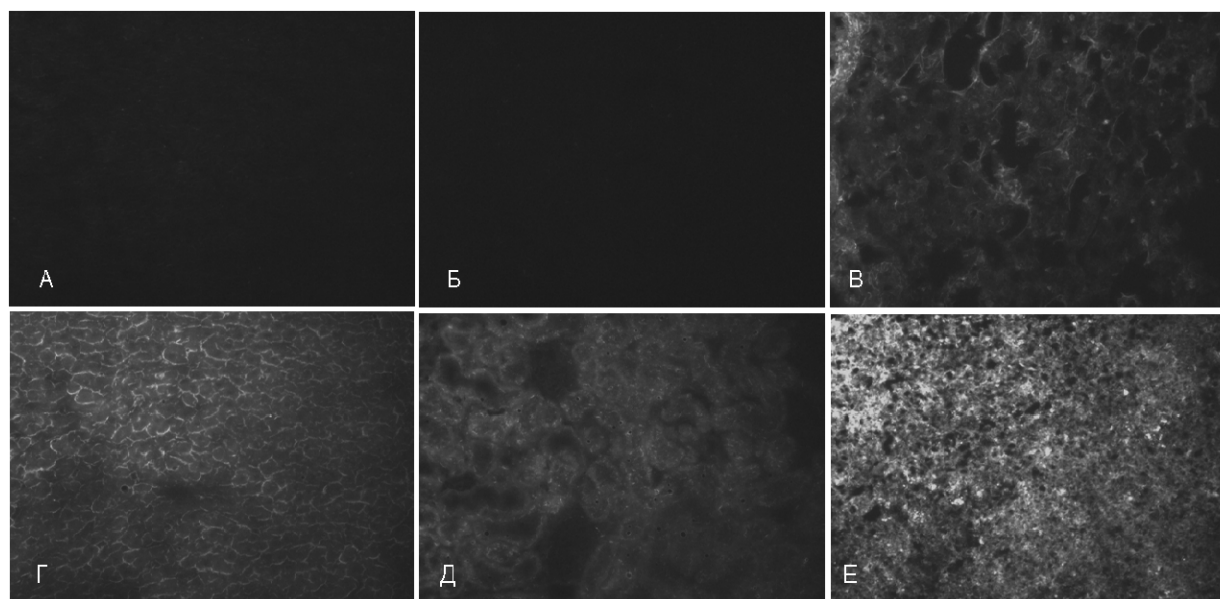


Рис. 4. Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 50 нм через 3 суток после системного введения. Ув. x 200

А – миокард, Б – головной мозг, В – легкие, Г – печень, Д – почка, Е – селезенка

Распределение метки после системного введения липосом размером 50 нм отличалось от местного введения более выраженным накоплением метки в селезенке и печени; при этом в миокарде свечения не было отмечено (рис. 4).

В головном мозге свечение метки не наблюдалось как при местном, так и при системном введении липосом.

Обсуждение

При добавлении красителя РКН2 к смеси лецитина и холестерина он специфически связывается с липидами, оставаясь закрепленным в оболочке липосом. Таким образом, при визуализации флуоресцентной метки можно судить об органном распределении и накоплении липосом. Кроме того, по интенсивности

окрашивания мембран клеток можно сделать вывод о включении липосом в клетку.

По данным научной литературы, липосомы быстро поглощаются из кровотока и выводятся клетками ретикулоэндотелиальной системы [7; 10]. В нашем эксперименте было отмечено, что максимальное накопление меченных липосом происходит в печени, селезенке и почках независимо от способа введения (интрамиокардиальное/системное) и размера липосом (50 нм, 100 нм). При системном введении липосомы, по-видимому, полностью выводятся из кровотока и в других органах не обнаруживаются. Однако при местном введении часть липосом задерживается в миокарде.

Высказывались предположения, что внутримышечное введение липосом может приводить к их депонированию на срок до 6 суток [4]. Также существует мнение о сохранении липосомальной субстанции в межклеточном пространстве. Наши эксперименты также показали, что при интрамиокардиальном введении липосом размером 100 нм на 3 суток наблюдения отмечалось их накопление в межклеточном пространстве. За счет этого при местном введении липосом возможно осуществление пролонгированного эффекта включенного в их состав VEGF.

В случае введения липосом размером 50 нм не отмечено их накопления в межклеточном пространстве. Практически вся люминесценция наблюдалась в клеточных мембранах и цитоплазме кардиомиоцитов. Вероятно, липосомы этого размера интенсивнее поглощаются кардиомиоцитами.

В тканях легких отмечалось лишь незначительное включение липосом, преимущественно окрашивался эндотелий сосудов. Различий между группами с использованием липосом разного размера не наблюдалось.

Высказывались предположения, что липосомы должны хорошо проникать через гематоэнцефалический барьер и могут быть использованы для решения проблемы доставки лекарственных веществ в головной мозг [3]. Однако некоторые исследователи считают, что системное введение липосом недостаточно эффективно, так как количество попадающего в мозг препарата очень невелико. При этом местное введение не дает возможность получить равномерное распределение препарата в ткани головного мозга [11]. Отмечается, что эффективная доставка липосом в головной мозг достигается лишь при перфузии сонной артерии иммунолипосомами [5].

В данном эксперименте накопления липосомального препарата в головном мозге не наблюдалось как при местном, так и при системном введении липосом разного размера. Таким образом, негативного воздействия включенного в липосомы препарата на головной мозг не ожидается.

Вывод

При интрамиокардиальном и системном введении значительная часть липосомального препарата поглощается печенью и селезенкой. При местном введении в область моделированного инфаркта миокарда липосомы задерживаются в миокарде, а липосомы меньшего диаметра поглощаются клетками более интенсивно.

Литература

1. Барсуков, Л. И. Липосомы / Л. И. Барсуков // Соровский образовательный журнал. – 1998. – № 10.
2. Парфенова, Е. В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы / Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук // Кардиологический вестник. – 2007. – Т. 2. – № 2.
3. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века / В. И. Швец [и др.] // Рос. нанотехнол. – 2008. – № 3.
4. Шраер, Т. И. Применение взвеси липосом при экспериментальном локальном гнойном процессе / Т. И. Шраер, В. М. Крейнс, Н. А. Голубчикова // Хирургия. – 1988. – № 4.
5. Schnyder, A. Drug Transport to Brain with Targeted Liposomes / A. Schnyder, J. Huwyler // NeuroRx. – 2005. – Т. 2. – № 1.
6. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects / S. E. Epstein [et al.] // Circulation. – 2001. – № 104.
7. Pharmacokinetics and organ distribution of cyclosporin A incorporated in liposomes and mixed micelles / M. K. Lee [et al.] // Int J Pharm. – 1999. – Т. 191. – № 2.
8. Gene transfers of VEGF-A, VEGF -B, VEGF -C and VEGF -D have now effects on atherosclerosis in hypercholesterolemic LDLR/APOB48-deficient mice / P. Leppanen [et al.] // Circulation. – 2005. – № 112.
9. Effective targeting of liposomes to liver and hepatocytes in vivo by incorporation of a Plasmodium amino acid sequence / K. J. Longmuir [et al.] // Pharm Res. – 2006. – Т. 23. – № 4.
10. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs / M. Lee [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 1999. – № 191.
11. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging / R. Saito [et al.] // Cancer research. – 2004. – № 64.

Информация об авторах:

Великанова Елена Анатольевна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, velikanova_ea@mail.ru.

Elena A. Velikanova – junior researcher at Cell Technology Laboratory, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences.

Головкин Алексей Сергеевич – кандидат медицинских наук, заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, 64-41-56.

Alexey S. Golovkin – Candidate of Medicine, Head of Experimental and Clinical Cardiology Department, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences.

Мухамадияров Ринат Авхадиевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований тканей НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН.

Rinat A. Mukhamadiarov – Candidate of Biology, leading researcher at Laboratory for Ultrastructural Tissue Studies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences.

Торопова Яна Геннадьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН.

Yana G. Toropova – researcher at Cell Technology Laboratory, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences.

Лисаченко Геннадий Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия, 73-48-56.

Gennady V. Lisachenko – Doctor of Medicine, Professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Kemerovo State Medical Academy.