

УДК 577.35:615.281:616-002.5:612.112.3

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ЛИПОСОМ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ СРЕДСТВОМ (ДЕКСТРАЗИДОМ) В КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ

^{1,2}Архипов С.А., ^{1,2}Шкурупий В.А., ¹Нешчадим Д.В., ¹Ахраменко Е.С., ¹Троицкий А.В.,
¹Ильин Д.А., ¹Гуляева Е.П.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины»,
Новосибирск, e-mail: arhipov@centercem.ru

²ГОУВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»

In vitro исследовали биосовместимость макрофагов (МФ) и фосфатидилхолиновых липосом (ЛП) с декстразидом – противотуберкулезным средством (модифицированным декстраном М.м. 40 кДа с гидразидом изоникотиновой кислоты) в зависимости от размеров ЛП (0,15-0,20; 0,20-0,45 мкм), концентрации ЛП, концентрации декстразида в среде для культивирования (50, 100 и 150 мкг/мл) и времени инкубации МФ с ЛП (48 и 72 час). Концентрация декстразида внутри жидкой фазы ЛП с декстразидом составила 10000 мкг/мл. Цитотоксические свойства среды для культивирования, содержащей ЛП с декстразидом размерностью 0,15-0,20 мкм и «свободный» декстразид (100 мкг/мл), проявлялись через 48 часов культивирования при их концентрации в культуре, соответствующей эквиваленту концентрации фосфатидилхолина 100 мкг/мл. Цитотоксические свойства среды для культивирования, содержащей ЛП с декстразидом размерностью 0,20-0,45 мкм и «свободный» декстразид (150 мкг/мл), проявлялись через 72 часа культивирования при их концентрации в культуре, соответствующей эквиваленту концентрации фосфатидилхолина 150 мкг/мл. Полученные данные указывают на то, что фосфатидилхолиновые ЛП, содержащие декстразид, могут рассматриваться как перспективное противотуберкулезное средство для подавления внутриклеточно персистирующих микобактерий туберкулеза.

Ключевые слова: средство лечения туберкулеза, декстразид, липосомы, цитотоксичность, макрофаги, *in vitro*

STUDY OF BIOCOMPATIBILITY LIPOSOMES WITH ANTITUBERCULOUS DRUG (DEKSTRAZID) IN THE MACROPHAGE CULTURES

^{1,2}Arkhipov S.A., ^{1,2}Shkurupy V.A., ¹Neshchadim D.V., ¹Akhramenko E.S.,
¹Troitsky A.V., Iljin D.A.¹, Gulyaeva E.P.³

¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, e-mail: arhipov@centercem.ru

²Novosibirsk State Medical University

The biocompatibility of macrophages (MPH) and phosphatidylcholine liposomes (LP) with dekstrazid - antituberculosis agent (modified dextran MW 40 kDa with isonicotinic acid hydrazide), depending on the size of the LP (0,15-0,20; 0,20-0,45 microns), concentration of dekstrazid in the culture medium (50, 100 and 150 ug / ml) and incubation time with MPH with LP (48 and 72 hour) examined *in vitro*. The concentration of dekstrazid in the liquid phase of LP amounted to 10,000 ug / ml. Cytotoxic properties of culture media containing LP with dekstrazid dimension of 0,15-0,20 micron and the "free" dekstrazid (100 ug / ml) were shown after 48 hours incubation at concentrations in the culture, the corresponding equivalent phosphatidylcholine concentration of 100 ug / ml. The cytotoxic properties of culture media containing the LP with dekstrazid dimension 0,20-0,45 and a "free" dekstrazid (150 ug / ml) were shown after 72 hours of incubation at concentrations in the culture corresponding to the equivalent concentration of phosphatidylcholine 150 ug / ml. These data indicate that the LP phosphatidylcholine containing dekstrazid can be considered as a promising antituberculosis drugs to suppress the persistent intracellular *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: antituberculous drug, dekstrazid, liposomes, cytotoxicity, macrophages, *in vitro*

Введение

Одно из перспективных направлений в фармакологии – создание новых лекарственных форм или композиций адресного действия с заданными фармакокинетическими свойствами и содержанием в них субстанций, имеющих минимальные побочные эффекты [1, 3, 4, 6]. К лекарственным средствам нового поколения относят композиционные системы в корпускулярных контейнерах с направленной доставкой в клетки, к которым относятся липосомы, а также высокомолекулярные

полимерные носители лекарственных веществ (белки, полисахариды, их комплексы с различными субстанциями и др.) [1, 2, 7]. Неослабевающий интерес к липосомам обусловлен их относительной химической инертностью, универсальностью, биосовместимостью, биodeградируемостью [1, 5, 9]. Разработка новых композиционных корпускулярных носителей предполагает обязательное проведение исследований по их биосовместимости и цитотоксичности в отношении клеток-мишеней при включении в них активно действующих лекарственных средств. Ранее нами было показано [7, 4, 9],

что липосомы и декстразиды, синтезированные в результате конъюгации окисленных декстранов и гидразида изоникотиновой кислоты, могут представлять интерес как перспективное противотуберкулезное средство для лечения внутриклеточно персистирующей туберкулезной инфекции – *M. tuberculosis*, в связи с их накоплением в фаголизосомах – месте их персистенции, что способствует адресному воздействию на микобактерии, с другой – существенно снижает гепатотоксические и общетоксические осложнения. Однако, цитотоксические эффекты липосом, содержащих декстразид, в отношении фагоцитирующих их клеток макрофагальной системы (место персистенции *M. tuberculosis*) не были изучены.

Целью настоящего исследования было изучение биосовместимости липосом, содержащих декстразид с М.м. 40 кДа, и макрофагов, по степени проявления цитотоксических эффектов липосомальной композиции в зависимости от их концентрации в культурах и времени культивирования.

Материалы и методы исследования

Исследование биосовместимости липосом, содержащих декстразид с М.м. 40 кДа – конъюгат гидразида изоникотиновой кислоты с модифицированным декстраном [7], проводили *in vitro* на макрофагах (МФ), выделенных из перитонеального трансудата мышей-самцов линии BALB/c 2-х месячного возраста, с массой тела 21-22 гр., полученных из питомника Института клинической иммунологии СО РАМН (г. Новосибирск, Россия). Перитонеальные МФ получали после выведения животных их эксперимента путем дислокации позвонков в шейном отделе под легким эфирным наркозом. Клетки из перитонеального трансудата эксплантировали в культуру и культивировали при 370 С в пластиковых чашках Петри (40 мм) в течение 3-х часов на покровных стеклах для прикрепления МФ (106 клеток в 1,5 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров). Через 3 часа неадгезированные клетки смывали средой для культивирования. Полученные первичные культуры МФ культивировали в течение 24 часов с целью их адаптации для последующих экспериментальных воздействий.

Для получения липосом, содержащих декстразид (ЛПД), 20 мг фосфатидилхолина (Sigma, USA) помещали в 2 мл раствора декстразида М.м. 40 кДа (в 0,9 % NaCl) в концентрации 10000 мкг/мл, полученного на основе окисленного декстрана с максимальной степенью окисления (при содержании гидразида изоникотиновой кислоты – 5 мг/мл), и оставляли набухать при температуре 4 - 6° С на 24 часа [7, 8]. Для получения липосом заданной размерности липидную суспензию многократно продавливали через ацетатцеллюлозные фильтры (Sartorius, Germany), первоначально через фильтр с диаметром пор 0,8 мкм, затем через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и на завершающем этапе через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. В результате получали фракции липосом в размерных

диапазонах 0,15-0,20 мкм и 0,20-0,45 мкм [7, 9], содержащие декстразид внутри жидкой фазы липосом в концентрации 10000 мкг/мл. При таком способе получения липосом концентрация «свободного» (вне липосом) декстразида в исходной суспензии была эквивалентна его концентрации в липосомах. Включение декстразида в липосомы в составе жидкой фазы верифицировали в дополнительном методическом эксперименте при использовании вместо декстразида его химического «аналога» - окисленного декстрана с М.м. 40 кДа, меченного флуоресцеином. При этом отмечено, что при разбавлении таких липосом в 100 и более раз интенсивность их флуоресценции не снижается, что свидетельствует об их стабильности и сохранении декстрана во внутренней жидкой фазе липосом в той концентрации, которая была в рабочем растворе при их получении, т.е. 10000 мкг/мл.

Эффекты, характеризующих биосовместимость ЛПД проводили по их влиянию на жизнеспособность перитонеальных МФ [7, 8]. Исследовали *in vitro* цитотоксические эффекты ЛПД на МФ в зависимости от размеров липосом (0,15-0,20, 0,20-0,45 мкм), концентрации липосом в культуральной среде, соответствующей эквиваленту концентрации фосфатидилхолина (50, 100 и 150 мкг/мл), концентрации в среде свободного декстразида (50, 100 и 150 мкг/мл) и времени инкубации МФ с ЛПД (48 и 72 час). Дополнительно исследовали цитотоксические эффекты «пустых» липосом (ЛП) различной размерности (0,15-0,20, 0,20-0,45 мкм), соответствующей эквиваленту концентрации фосфатидилхолина (50, 100 и 150 мкг/мл), и эффекты «свободного» декстразида, в той концентрации, которая оставалась в суспензиях с ЛПД после их соответствующего разведения. Жизнеспособность (% живых перитонеальных клеток) в культурах оценивали при помощи витальной окраски трипановым синим [7, 8]. Подсчитывали долю (в процентах) макрофагов, окрашенных трипановым синим. В качестве общего контроля служили интактные культуры перитонеальных макрофагов.

Статистическую обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики. Данные представлены в виде средних арифметических величин и ошибок средних величин. Вероятность достоверности различий сравниваемых средних величин осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет прикладных программ «Statistica 7.0».

Результаты и обсуждение

Согласно данным, представленным в таблице 1, культивирование МФ в среде, содержащей ЛП с размерностью 0,15-0,20 мкм, не приводит к заметным цитотоксическим эффектам даже через 72 часа после их внесения в культуры клеток. При культивировании МФ в среде, содержащей суспензии ЛП размерностью 0,20-0,45 мкм, отмечено незначительное возрастание количества нежизнеспособных МФ через 72 часа культивирования в среде с ЛП при использовании максимальной концентрации ЛП, соответствующей эквиваленту концентрации фосфатидилхолина 150 мкг/мл. Таким образом, в предварительных экспериментах было показано, что в ис-

следуемой экспериментальной модели ЛПД с размерностью 0,15-0,20 и 0,20-0,45 мкм обладают высокой биосовместимостью в отношении культивируемых *in vitro* МФ.

Таблица 1

Результаты исследования *in vitro* влияния «пустых» липосом на жизнеспособность макрофагов *in vitro*

Время инкубации, час	Размеры липосом, мкм	Количество нежизнеспособных макрофагов, %			Контроль
		При концентрации липосом в ФХЛ экв.: мкг/мл			
		50	100	150	
48	0,15-0,20	1,2±0,07	1,5±0,09	2,9±0,11*	0,9±0,06
	0,20-0,45	1,4±0,09	2,1±0,11	2,6±0,19*	1,0±0,08
72	0,15-0,20	1,4±0,08	1,8±0,10	2,7±0,14*	1,1±0,07
	0,20-0,45	2,1±0,12	2,3±0,13	2,8±0,12*	1,2±0,09

Примечание. Различия представлены в виде: * $P < 0,05$ (при сравнении показателей у макрофагов в «Контроле» с показателями в «экспериментальных» группах культур макрофагов, инкубированных с липосомами). «Контролем» служили макрофаги, культивируемые в среде для культивирования, не содержащей липосомы. Обозначения: ФХЛ экв. – весовой эквивалент фосфатидилхолина.

В таблице 2 представлены результаты исследования цитотоксических эффектов «свободного» декстразида (без липосом), в

концентрациях, эквивалентных концентрациям декстразида, содержащихся в среде с тестируемыми разведениями липосом: 50, 100 и 150 мкг/мл. Показано, что цитотоксическое действие декстразида начинало проявляться при его концентрации в среде для культивирования 100 мкг/мл через 48 часов после его внесения, достигая еще больших значений при концентрации 150 мкг/мл. При увеличении времени культивирования до 72 часов цитотоксический эффект декстразида несколько возрастал при концентрации 150 мкг/мл.

Таблица 2

Результаты исследования *in vitro* влияния «свободного» декстразида на жизнеспособность макрофагов *in vitro*

Время инкубации, час	Количество нежизнеспособных макрофагов, %			Контроль
	При концентрации декстразида: мкг/мл			
	50	100	150	
48	2,3±0,14	3,3±0,17	4,5±0,22*	2,2±0,12
72	2,4±0,16	3,9±0,19*	5,3±0,27*	2,3±0,15

Примечание. Различия представлены в виде: * $P < 0,05$ (при сравнении показателей у макрофагов в «Контроле» с показателями в «экспериментальных» группах культур макрофагов, инкубированных с декстразидом). «Контролем» служили макрофаги, культивируемые в среде для культивирования, не содержащей декстразид.

Липосомы, «нагруженные» декстразидом (ЛПД), в размерном диапазоне 0,15-0,20 мкм при концентрациях, соответствующих эквивалентам концентрации фосфатидилхолина 100-150 мкг/мл и концентрациям

«свободного» декстразида в культуральной среде 100-150 мкг/мл обладали заметным цитотоксическим действием (табл. 3). Напротив, цитотоксичность ЛПД в размерном диапазоне 0,20-0,45 мкм при аналогичных концентрациях ЛПД и свободного декстразида (100-150 мкг/мл) не превышала таковую «пустых» липосом такой же размерности и была ниже, чем «свободного» декстразида в соответствующих концентрациях (100-150 мкг/мл). Среда для культивирования, содержащая и «свободный» и внутрилипосомальный декстразид, обладала

большей цитотоксичностью видимо в связи с адгезией на поверхности липосом небольшого количества декстразида, а также его попадания в «смесь» липосом и декстразида. Причем следует учитывать, что более мелкие липосомы имели большую суммарную поверхность в равной единице объема, чем более крупные.

Таким образом, показано, что ЛПД в размерном диапазоне 0,20-0,45 мкм обладали менее выраженными цитотоксическими свойствами, чем ЛПД в размерном диапазоне 0,15-0,20 мкм. Цитотоксические

свойства ЛПД с размерностью 0,15-0,20 мкм проявлялись через 48 часов культивирования при их концентрации, соответствующей эквивалентам концентрации фосфатидилхолина 100 мкг/мл, и концентрации «свободного» декстразида в культуральной среде 100 мкг/мл. Цитотоксические свойства ЛПД с размерностью 0,20-0,45 мкм проявлялись через 72 часа культивирования при их концентрации, соответствующей эквивалентам концентрации фосфатидилхолина 150 мкг/мл, и концентрации «свободного» декстразида в среде 150 мкг/мл.

Таблица 3

Результаты исследования *in vitro* влияния на жизнеспособность макрофагов среды для культивирования, содержащей липосомы с декстразидом и «свободный» декстразид

Время инкубации, час	Размеры липосом, мкм	Количество нежизнеспособных макрофагов, %			Контроль
		Концентрация липосом с декстразидом (мкг/мл в ФХЛ экв.) + Концентрация «свободного» декстразида (мкг/мл)			
		50+50	100+100	150+150	
48	0,15-0,20	2,7±0,15	5,6±0,29*	6,5±0,32*	1,2±0,08
	0,20-0,45	2,4±0,12	2,7±0,14	3,3±0,17	2,1±0,13
72	0,15-0,20	2,9±0,16	6,2±0,33*	7,2±0,38*	1,8±0,11
	0,20-0,45	2,5±0,10	2,8±0,15	4,1±0,21*	2,3±0,14

Примечание. Различия представлены в виде: * P<0,05 (при сравнении показателей у макрофагов в «Контроле» с показателями в «экспериментальных» группах культур макрофагов, инкубированных в среде, содержащих липосомы с декстразидом, и «свободный» (вне липосом) декстразид. «Контролем» служили макрофаги, культивируемые в среде для культивирования, не содержащей декстразид с липосомами. Обозначения: ФХЛ экв. – весовой эквивалент фосфатидилхолина.

Ранее было показано, что цитопатогенный эффект гидразида изоникотиновой кислоты может быть снижен при конъюгации гидразида изоникотиновой кислоты с окисленными декстраном [2]. Декстразид - конъюгат гидразида изоникотиновой кислоты с модифицированным декстраном обладает свойством накапливаться в клетках СМФ, РЭС, а также в гепатоцитах. Если придать ему свойства корпускулярности, то это исключает его захват клетками эндотелия синусоидов печени и гепатоцитами. Это существенно понизит его гепатотоксичность и повысит эффективность в отношении микобактерий туберкулеза, персистирующих в макрофагах [2, 6, 7].

В представленной нами работе цитотоксическое действие декстразида в отно-

шении МФ проявлялось при концентрации 150 мкг/мл. Вместе с тем, внутри ЛПД в составе ЛПД концентрация декстразида достигала 10000 мкг/мл, а цитотоксический эффект ЛПД проявлялся только при достижении их концентрации 100 мкг/мл в эквиваленте фосфатидилхолина. Таким образом, установлено, что заключение декстразида в ЛПД значительно снижает цитотоксические свойства декстразида, но повышает его микробицидность в отношении внутриклеточно персистирующих микобактерий туберкулеза.

Ранее нами было показано, что фагоцитозная активность МФ в отношении ЛПД зависит от их размеров [4, 9]. Показано, что количество ЛПД, фагоцитированных МФ, возрастает при уменьшении размеров ЛПД. Согласно этим данным более высокую цитотоксичность ЛПД с размерами 0,15-0,20 мкм по сравнению с ЛПД 0,20-0,45 мкм можно, вероятно, объяснить более быстрым захватом ЛПД с размерами 0,15-0,20 мкм и накоплением в большем количестве в МФ за одинаковый промежуток времени. Не исключено, что испытываемое средство может отчасти решать проблему лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, персистирующих внутриклеточно, потому что декстран

в составе гибридной молекулы декстразида увеличивает частоту слияния фагосом с лизосомами и создает в фаголизосоме очень высокие концентрации гидразида изоникотиновой кислоты, в тоже время его концентрация в крови может быть много меньше, чем если бы вводили в организм «чистый» гидразид изоникотиновой кислоты.

Закключение

Полученные данные указывают на то, что ЛПД, могут рассматриваться как перспективное противотуберкулезное средство для лечения внутриклеточно персистирующих и «свободных» *M. tuberculosis*. Результаты исследования также могут быть использованы при разработке и оптимизации новых перспективных биосовместимых контейнеров на основе липосомальных конструкций для биологически активных веществ и лекарственных препаратов с целью их адресной доставки в различные клетки и ткани-мишени, обладающие фагоцитозной активностью.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины»

Список литературы

1. Кузякова Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2005. Т. 46, № 1
2. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М., Изд-во РАМН, 2007. 536 с.
3. Шкурупий В.А., Овсянко Е.В., Надев А.П. и др. Динамика клеточных преобразований в кандидозных гранулемах лимфатических узлов при лечении лизосомотропной формой амфотерицина В в эксперименте // Морфология. 2005. Т. 128.
4. Arkhipov S.A., Shkurupy V.A., Troitsky A.V., Luzgina N.G., Ufimceva E.G., Zaikovskaja M.V., Iljine D.A., Akhramenko E.S., Gulyaeva E.P., Bistrova T.N. Phagocytic activity of macrophages against liposomes with conjugates of oxidized dextrans and isonicotinic acid hydrazide during modeling of phagocytosis disturbances in vitro // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2009. Т. 148. №4. С. 689-691.
5. Matsuo H., Chevallier J., Mayran N., Le Blanc I., Ferguson C., Faure J., Sartori Blanc N., Matile S., Dubochet J., Sadoul R., Parton R. G., Vilbois F., Gruenberg J. Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization // Science. 2004. V. 303. P. 531-534.
6. Shkurupy V.A., Krasnov V.A., Gulyaeva E.P., Troitskiy A.V., Grishin O.V., Bogdanova L.A., Machneva T.V., Auslender V.L., Korobeinikov M.V. Production of new antituberculosis drug and other medical preparations by electron beam treatment // Radiation Physics and Chemistry. 2002. № 63. P. 691-695.
7. Shkurupy V.A., Arkhipov S.A., Tkachev V.O., Troitsky A.V., Luzgina N.G., Zaikovskaja M.V., Gulyaeva E.P., Bistrova T.N., Ufimceva E.G. In vitro effects of molecular nanosomal hybrid compositions with oxidized dextrans, conjugated with isonicotinic acid hydrazine on peritoneal macrophages // Bull. Exp. Biol. Med. 2008 Vol. 146, № 5. P. 627-629.
8. Shkurupy V.A., Arkhipov S.A., Troitsky A.V., Luzgina N.G., Zaikovskaja M.V., Gulyaeva E.P., Bistrova T.N., Ufimceva E.G., Iljin D.A., Akhramenko E.S. In Vitro Effect of Oxidized Dextrans on Peritoneal Cells // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008. Vol. 146, № 6. P. 868-870.
9. Shkurupy V.A., Arkhipov S.A., Troitsky A.V., Luzgina N.G., Zaikovskaja M.V., Gulyaeva E.P., Bistrova T.N., Ufimceva E.G., Iljin D.A., Akhramenko E.S. Comparative study of the in vitro effect of nanoliposomes with oxidized dextrans on peritoneal cells // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. Vol.146, № 6. P. 871-874.