

УДК 577.35:615.281:616-002.5:612.112.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОСОМ С ДЕКСТРАЗИДОМ НА ЭКСПРЕССИЮ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ MMP-1 И MMP-9 МАКРОФАГАМИ IN VITRO

¹Нещадим Д.В., ^{1,2}Архипов С.А., ^{1,2}Шкурупий В.А., ¹Ахраменко Е.С., ¹Троицкий А.В.

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

²ГОУВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск

В экспериментах *in vitro* исследовали влияние фосфатидилхолиновых липосом (ЛП) с декстразидом (ДЗ) – противотуберкулезным средством (композиция окисленного декстрана М.м. 60 кДа с гидразидом изоникотиновой кислоты) на экспрессию перитонеальными макрофагами (МФ) мышей металлопротеиназ – MMP-1 и MMP-9. В экспериментах использовали ЛП двух размеров (0,15-0,20; 0,20-0,45 мкм). Культивирование перитонеальных МФ в среде, содержащей ЛП с декстразидом (ЛП-ДЗ) с размерами 0,15-0,20 мкм в течение 1 сут, приводило к увеличению количества МФ, экспрессирующих MMP-1 и MMP-9, и показателя экспрессии ими этих ферментов. При использовании ЛП-ДЗ с размерами 0,20-0,45 мкм наблюдали увеличение экспрессии MMP-1 и MMP-9 МФ без изменения количества МФ, их экспрессирующих. Показано, что увеличение экспрессии исследуемых металлопротеиназ МФ при эндоцитозе ими ЛП-ДЗ может быть обусловлено стимуляцией МФ декстраном, входящим в состав декстразида. Полученные данные указывают на способность ЛП, ДЗ и ЛП-ДЗ модулировать гидролитический потенциал МФ.

Ключевые слова: липосомы, декстразид – противотуберкулезное средство, макрофаги, металлопротеиназы, *in vitro*

STUDY OF THE INFLUENCE OF LIPOSOMES WITH DEKSTRAZID ON THE EXPRESSION OF METALLOPROTEINASES MMP-1 AND MMP-9 BY MACROPHAGES IN VITRO

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

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

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

In vitro experiments the effect of phosphatidylcholine liposomes (LP) with dekstrazid (DZ) – antituberculosis agent (composition of the oxidized dextran Mw 60 kDa with isonicotinic acid hydrazide) on expression of metalloproteinases MMP-1 and MMP-9 by peritoneal macrophages (MPs) of mice are examined. In the experiments used two sizes of LP (0,15-0,20; 0,20-0,45 micrometers). Cultivation of peritoneal MPs in the medium containing LP with dekstrazid (LP-DZ) with dimensions of 0.15-0.20 μm within 1 day, led to the increase in the number of MPs expressing MMP-1 and MMP-9 and indicators of expression of these enzymes. When using the LP-DZ with the size of 0.20-0.45 μm observed an increased expression of MMP-1 and MMP-9 without changes of MPs number of MPs their expressing. It is shown that the increase in the expression of the studied metalloproteinases by MPs when they endocytosis of LP-DZ may be due to the stimulation of MPs with dextran, which is part dekstrazid. The obtained results indicate the ability of the LP, DZ and LP-DZ to modulate hydrolytic potential of MPhs.

Keywords: liposomes, dekstrazid – anti-tuberculosis drugs, macrophages, metalloproteinase, *in vitro*

Лекарственные средства, заключенные в ЛП, позволяют осуществлять их направленную доставку в клетки, в частности в МФ [3, 5, 10]. Такая форма лизосомотропных лекарственных средств актуальна для лечения туберкулеза, так как при этом заболевании возбудитель (*M. tuberculosis*) паразитирует в вакуолярно-лизосомальном [6, 7, 8] аппарате МФ, где его уничтожение представляет наибольшую проблему. Включение в ЛП определенных размеров противотуберкулезных средств с высокой гепатотоксичностью, к которым относится и основной противотуберкулезный препарат – гидразид изоникотиновой кислоты, снижает риски повреждения печени – гепатоцитов и клеток эндотелия синусоидов печени, которые не способны захватывать корпускулярный материал в определенном размерном диа-

пазоне. «Корпускулярность» лекарственной формы при ее захвате МФ может быть сопряжена с активацией синтеза и секреции МФ различных ферментов, среди которых представляют интерес матриксные протеиназы, как факторы с потенциальной антифибротической активностью [2, 4, 9]. Ранее нами было показана высокая антифибротическая активность декстразида [7], но механизм этого феномена еще не вполне понятен. Вместе с тем, известно, что свойство «корпускулярности» ЛП в сочетании с их способностью «экранировать» заключенные в них макромолекулы с относительно невысокой биodeградебельностью может обусловить развитие в организме стойкой реакции активации системы мононуклеарных фагоцитов, в частности, усилении экспрессии и секреции протеаз [4].

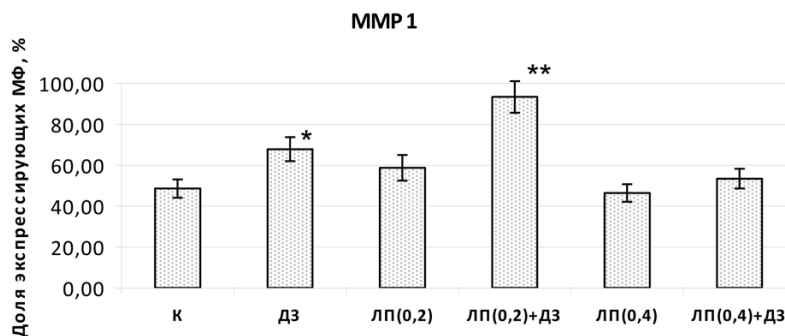


Рис. 1. Результаты исследования *in vitro* количества макрофагов (%), экспрессирующих ММР-1, после добавления в среду ЛП, ДЗ и ЛП-ДЗ. Достоверность различий представлена при сравнении средних величин показателей всех экспериментальных групп с величинами показателей в контроле (К) в виде: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Обозначения: ДЗ – «свободный» декстразид, ЛП (0,2) – липосомы с размерами 0,15-0,20 мкм, ЛП (0,4) – липосомы с размерами 0,20-0,45 мкм, ЛП-ДЗ – композиция из ДЗ и липосом

К одним из ключевых ферментов, принимающих участие как в воспалительных, так и в репаративных восстановительных процессах в различных тканях относят металлопротеиназы ММР-1 и ММР-9 со способностью гидролиза молекул внеклеточно-го матрикса, в частности коллагена.

В этой связи представляется полезным исследовать эффекты ЛП-ДЗ на «внеклеточный» гидролитический потенциал МФ, в частности, ММР-1 и ММР-9, о котором судили по экспрессии металлопротеиназы – ММР-1 и ММР-9, обладающих как продеструктивным (провоспалительным) потенциалом, так и свойством гидролиза структур молекул внеклеточного матрикса, в частности коллагена, при нейтральном рН, что характерно для заключительной (репаративной) фазы воспаления, сопровождающейся синтезом коллагена, приводящего к фиброзированию органов.

Целью настоящего исследования было изучение влияния липосом различных размеров с размещенной в них композиции с декстразидом М.м. 60 кДа, а также «пустых» липосом и «свободного» декстразида в качестве контроля, на экспрессию макрофагами матриксных металлопротеиназ ММР-1 и ММР-9 *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследование биологических эффектов «пустых» ЛП и ЛП-ДЗ – ЛП, включающих ДЗ (гидразид изоникотиновой кислоты с окисленным декстраном М.м. 60 кДа [1]), проводили *in vitro* на МФ, выделенных из перитонеального трансудата мышей-самцов линии BALB/c 2-х месячного возраста, с массой тела 21-22 гр., полученных из питомника ФГБНУ Института клинической иммунологии ФАНО России (г. Новосибирск, Россия). Перитонеальные МФ получали от интактных животных после дислокации их позвонков

в шейном отделе под легким эфирным наркозом. Клетки из перитонеального трансудата эксплантировали в культуру и культивировали при температуре 37°C и 5%-ном содержании CO₂ в пластиковых планшетах 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 (ЛП-ДЗ), 20 мг фосфатидилхолина (Sigma, USA) помещали в 2 мл раствора декстразида с М.м. 40 кДа (в 0,9% NaCl) в концентрации 10 мг/мл, полученного на основе окисленного декстрана (при содержании гидразида изоникотиновой кислоты – 5 мг/мл), и оставляли набухать при температуре 4-6°C на 24 часа [1, 10]. Для получения ЛП-ДЗ заданной размерности липидную суспензию многократно продавливали через ацетат-целлюлозные фильтры (Sartorius, Germany) как это было описано ранее [1, 10]. В результате получали фракции ЛП-ДЗ в размерных диапазонах 0,15-0,20 мкм и 0,20-0,45 мкм [1], содержащих декстразид внутри жидкой фазы липосом в концентрации 10 мг/мл. При таком способе получения липосом концентрация «свободного» (вне липосом) декстразида в исходной суспензии была эквивалентна его концентрации в липосомах. На начальном этапе получения «пустых» липосом 20 мг фосфатидилхолина помещали в 2 мл 0,9% раствора NaCl; далее проводили процедуры по схеме (для получения ЛП-ДЗ), приведенной выше. Исследовали влияние ЛП-ДЗ (в конечном разведении исходной суспензии ЛП-ДЗ в среде для культивирования 1:100) разных размеров (0,15-0,20, 0,20-0,45 мкм) на экспрессию металлопротеиназы-1 (ММР-1) и металлопротеиназы-9 (ММР-9) МФ. Дополнительно исследовали биологические эффекты «пустых» ЛП тех же размеров с эквивалентным содержанием фосфатидилхолина 100 мкг/мл и «свободного» ДЗ в конечном разведении в среде для культивирования 100 мкг/мл. В качестве общего контроля служили «интактные» культуры перитонеальных макрофагов. Оценку влияния ЛП и ЛП-ДЗ на экспрес-

сию MMP-1 и MMP-9 МФ проводили через 24 часа после их внесения в первичные культуры МФ. Внесение ЛП-ДЗ и ЛП в культуры МФ осуществляли путем одноразовой замены изначальной среды культивирования на среду, содержащую ДЗ, ЛП-ДЗ и ЛП в соответствующей концентрации.

Иммуноцитохимическое исследование экспрессии MMP-1 и MMP-9 проводили непрямым иммуноцитохимическим методом при помощи полимерной системы ImmPRESS Anti-Rabbit Ig Polymer Detection Kit (США) в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя. Для исследования экспрессии ферментов МФ, МФ в культурах фиксировали 4% водным раствором нейтрального формалина, демаскирование исследуемых ферментов проводили тритоном X-100 (0,3% раствор в фосфатном буфере, pH = 7,2). Экспрессию MMP-1 и MMP-9 выявляли при помощи антител: anti-MMP-9 (Isotype: Rabbit polyclonal antibody; C.N. ab38898; Abcam, США); anti-MMP-1 (Isotype: Rabbit polyclonal antibody; C. N. PAB12708, Abnova, США). Для визуализации кроличьих первичных антител использовали полимерную систему ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit – Vector Labs MP-7401-15 (США). Окраску препаратов проводили в растворе хромогена диаминобензидина (DAB), содержащем H_2O_2 .

расчет средней площади окрашенных зон цитоплазмы в пересчете на один МФ – усредненный показатель экспрессии (в условных единицах). Статистическую обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики. Данные представляли в виде средних арифметических величин и их ошибок. Вероятность достоверности различий сравниваемых средних величин определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет прикладных программ «Statistica 7.0» (StatSoft. Inc. 2004).

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно полученным данным (рис. 1), культивирование МФ в среде, содержащей «пустые» ЛП всех исследуемых размеров, не приводило к увеличению в культурах количества МФ с выраженной экспрессией MMP-1 (рис. 2). Увеличение количества МФ, экспрессирующих MMP-1 возросло при культивировании МФ с ЛП-ДЗ 0,15-0,20 мкм и в среде, содержащей

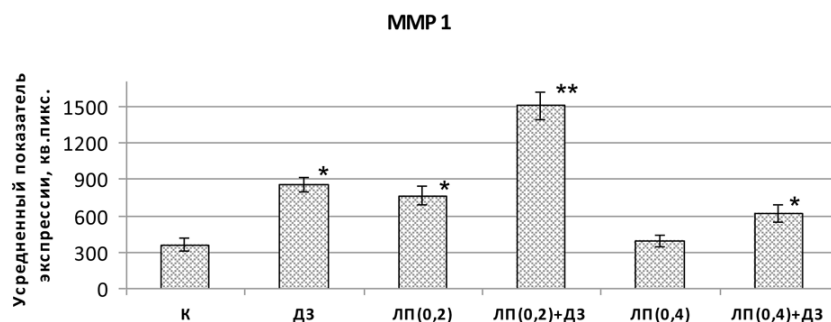


Рис. 2. Результаты исследования *in vitro* влияния ЛП, ДЗ и ЛП-ДЗ на уровни экспрессии макрофагами MMP-1. Достоверность различий представлена при сравнении средних величин показателей всех экспериментальных групп с величинами показателей в контроле (К) в виде: * $P < 0,05$, * $P < 0,01$. Обозначения: ДЗ – «свободный» декстразид, ЛП (0,2) – липосомы с размерами 0,15-0,20 мкм, ЛП (0,4) – липосомы с размерами 0,20-0,45 мкм, ЛП-ДЗ – композиция из ДЗ и липосом

Учитывали количество МФ, высокоэкспрессирующих MMP-1 и MMP-9 (у которых более половины цитоплазмы было окрашено ДАБ). Количество этих МФ выражали в%. Поскольку экспрессия исследуемых ферментов в той или иной степени выявлялась во всех МФ, то количественный анализ экспрессии MMP-1 и MMP-9 во всех исследуемых популяциях МФ в контрольной и экспериментальной группах проводили при помощи компьютерной морфометрии. Зоны цитоплазмы, содержащие выявляемые ферменты, окрашивались в коричневый цвет. Размеры окрашенных зон цитоплазмы МФ исследовали морфометрически в условных единицах по общей площади (в кв. пикселях) окрашенных зон (на пяти микрофотографиях, в которых размещалось от 50 до 70 МФ) после их фотографирования в микроскопе «AxioVision Z1» (Zeiss, Германия) при увеличении в 400 раз и с помощью морфометрического анализа цифровых откалиброванных изображений при помощи программы «ВидеоТест Морфо 3.2». Далее производили

«свободный» декстразид. При этом, инкубирование МФ с ДЗ приводило к увеличению экспрессии MMP-1 МФ в 2,4 раза. ЛП-ДЗ с размерами 0,15-0,20 и 0,20-0,45 мкм увеличили экспрессию MMP-1 МФ по сравнению с контролем соответственно в 4,2 и 1,7 раза. Стимуляция экспрессии MMP-1 МФ «пустыми» ЛП (повышение экспрессии в 2,1 раза) отмечена только при использовании ЛП меньших размеров (0,15-0,20 мкм).

При изучении влияния ДЗ, ЛП и ЛП-ДЗ на экспрессию MMP-9 МФ в целом были получены аналогичные закономерности. Культивирование МФ в среде, содержащей «пустые» ЛП всех исследуемых размерностей не приводило к увеличению в культурах количества МФ с выраженной

экспрессией ММР-9 (рис. 3). Увеличение количества МФ, экспрессирующих ММР-9 возросло только при культивировании МФ с ЛП-ДЗ 0,15-0,20 мкм и в среде, содержащей «свободный» декстразид. Инкубирование МФ с ДЗ приводило к увеличению экспрессии ММР-9 МФ в 2,3 раза. ЛП-ДЗ с размерами 0,15-0,20 и 0,20-0,45 мкм увеличили экспрессию ММР-9 МФ по сравнению с контролем соответственно в 2,9 и 1,9 раза. Стимуляция экспрессии ММР-9 МФ «пустыми» ЛП отмечена только при использовании ЛП меньших размеров (0,15-0,20 мкм).

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что фагоцитоз ЛП-ДЗ сопряжен с повышением экспрессии металлопротеиназ ММР-1 и ММР-9. «Пустые» ЛП размером 0,15-0,20 мкм также обладали такой способностью в отношении экспрессии ММР-1 и ММР-9, но в меньшей степени. При этом было выявлено, что определенный «вклад» в стимуляцию ЛП-ДЗ экспрессии ММР-1 и ММР-9МФ вносит ДЗ. Выявленная нами способность МФ, поглотивших ЛП-ДЗ, изменять экспрессию гидролаз, свидетельствуют о том, что ЛП, ДЗ и в большей степени ЛП-ДЗ, поглощенные МФ, способны модулировать их функциональный статус, что, видимо, может изменить развитие типовых процессов, таких как воспаление, репаративная регенерация или фиброз.

Ранее нами было показано, что количество ЛП-ДЗ, фагоцитированных МФ, возрастает при уменьшении размеров ЛП-ДЗ [8]. Очевидно, что и суммарный объем и количество захваченных ЛП меньших размеров будет большим,

чем ЛП-ДЗ более крупного размера. При этом будет захвачено и большее количество ингредиентов, размещенных в ЛП меньшего размера, нежели в более крупных. Следовательно можно ожидать более выраженных биологических эффектов у МФ на большее количество действующих факторов (декстрана и изониазида), но при этом следует принимать во внимание, что время пребывания ДЗ такого размера и количества будет большим (время для гидролиза). Следовательно, индуктивный «импульс» будет пролонгирован, чем, видимо, можно объяснить полученные эффекты [6, 8]. Это тем более вероятно, что декстраны лизосомотропны и медленно биодеградируемы. Время их полувыведения из организма около 3,5 суток [6].

Следует также отметить, что ЛП-ДЗ с размерами 0,15-0,20 мкм в большей степени стимулировали экспрессию ММР-1 и ММР-9 МФ, чем «свободный» декстразид. Напротив, эффект стимуляции экспрессии ММР-1 и ММР-9 МФ ЛП-ДЗ с размерами 0,20-0,45 мкм был слабее, чем ДЗ. Эти данные могут косвенно свидетельствовать о большей стабильности ЛП-ДЗ с размерами 0,20-0,45 мкм (т.е. о более медленном высвобождении ДЗ из комплекса ЛП-ДЗ), фагоцитированных МФ, по сравнению с ЛП-ДЗ с размерами 0,15-0,20 мкм. Кроме того, несмотря на сходные эффекты использованных в эксперименте лизосомотропных факторов, наблюдали определенные различия выраженности ответа на них МФ, при рассмотрении количества МФ, экспрессирующих ММР-1 и ММР-9, и активности проявления их синтеза (рис. 1, 2, 3, 4).

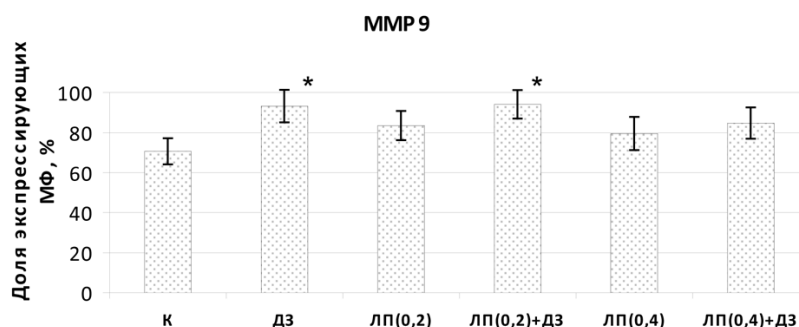


Рис. 3. Результаты исследования *in vitro* количества макрофагов (%), экспрессирующих ММР-9, после добавления в среду ЛП, ДЗ и ЛП-ДЗ. Достоверность различий представлена при сравнении средних величин показателей всех экспериментальных групп с величинами показателей в контроле (К) в виде: * $P < 0,05$, * $P < 0,01$. Обозначения: ДЗ – «свободный» декстразид, ЛП (0,2) – липосомы с размерами 0,15-0,20 мкм, ЛП (0,4) – липосомы с размерами 0,20-0,45 мкм, ЛП-ДЗ – композиция из ДЗ и липосом

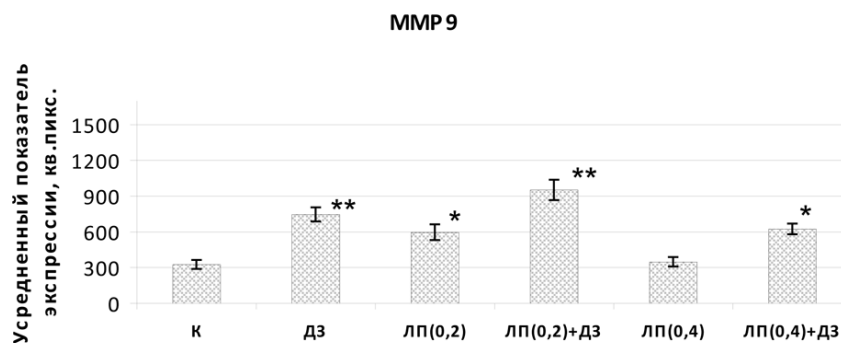


Рис. 4. Результаты исследования *in vitro* влияния ЛП, ДЗ и ЛП-ДЗ на уровни экспрессии макрофагами ММР-1. Достоверность различий представлена при сравнении средних величин показателей всех экспериментальных групп с величинами показателей в контроле (К) в виде: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Обозначения: ДЗ – «свободный» декстразид, ЛП (0,2) – липосомы с размерами 0,15–0,20 мкм, ЛП (0,4) – липосомы с размерами 0,20–0,45 мкм, ЛП-ДЗ – композиция из ДЗ и липосом

Заключение

Результаты исследования могут быть полезны для понимания эффектов лекарственных средств для лечения заболеваний с гранулематозным типом воспаления, осложненных фиброзом (туберкулез, кандидоз), а также при разработке других перспективных биосовместимых липосомальных «конструкций» с целью их адресной доставки в клетки-мишени, обладающие фагоцитозной активностью и, возможно, для профилактики и лечения фибротических осложнений при ряде патологических процессов.

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

Список литературы

1. Архипов С.А., Шкурупий В.А., Нецадим Д.В., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В., Ильин Д.А., Гуляева Е.П. Исследование биосовместимости липосом с противотуберкулезным средством (декстразидом) в культуре макрофагов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 9 (часть 1). – С. 74-78.
2. Долматов В.Ю. // Успехи химии. – 2011. – Т. 70. – № 7. – С. 687-693.
3. Кузякова Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами //

Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2005. – Т. 46. – № 1. – С. 74-79.

4. Нецадим Д.В., Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В., Карпов М.А. Модифицирующее влияние наноразмерных алмазов на гидролитический потенциал макрофагов *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159. – № 3. – С. 382-385.

5. Халикова Т.А., Короленко Т.А., Ильницкая С.И. // Биомедицинская химия. – 2009. – № 5. – С. 621-634.

6. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. – М., Изд-во РАМН, 2007. – 536 с.

7. Шкурупий В.А., Овсянко Е.В., Надеев А.П. и др. Динамика клеточных преобразований в кандидозных гранулемах лимфатических узлов при лечении лизосомотропной формой амфотерицина В в эксперименте // Морфология. – 2005. – Т. 128. – С.73-76.

8. 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. – Vol. 148. – № 4. – P. 689-691.

9. 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. – Vol. 303. – P. 531-534.

10. 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.