

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ УНИЛАМЕЛЛЯРНЫХ И МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫХ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ БИЕН, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫС

И. М. Бушмакина, М. А. Мартынова, Е. В. Князева¹

В экспериментах *in vitro* изучена фагоцитарная активность свежeweделенных альвеолярных макрофагов и их первичной культуры при их взаимодействии с липосомами, содержащими комплекс ненасыщенных жирных кислот Биен. Установлена количественная зависимость фагоцитарного числа и фагоцитарного показателя от концентрации липосомального Биена. Проведен сравнительный анализ влияния уни- и мультиламеллярных липосом, содержащих Биен, на клеточную суспензию.

Ключевые слова: Биен; мультиламеллярные липосомы; униламеллярные липосомы; альвеолярные макрофаги; фагоцитарная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В РУП “Белмедпрепараты” налажено производство серии лекарственных средств на основе Биена — комплекса этиловых эфиров одиннадцати полиненасыщенных жирных кислот и α -токоферола ацетата. По совокупности фармакологических эффектов Биен относится к репаративным и цитопротекторным средствам [3].

Можно предположить, что инкорпорирование Биена в липосомы позволит заложить основы получения новой формы высокоэффективного комплексного препарата для ингаляционной терапии заболеваний органов дыхания, обеспечивающего синергизм действия фосфолипидной и жирнокислотной составляющих, а микронный размер везикул даст возможность вводить препарат в организм в виде аэрозоля с помощью небулайзера.

Известно, что липосомы не только обладают способностью транспортировать лекарственные средства к пораженным тканям, но и сами обладают иммуностимулирующими, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Особенно целесообразным является использование наночастиц, в том числе и липосом, при заболеваниях инфекционной природы, поскольку и патогенные микроорганизмы, и липосомы, несущие антибиотики, захватываются преимущественно системой фагоцитирующих мононуклеаров, макрофагальными элементами крови и тканей, где и может непосредственно реализоваться действие лекарственного средства на возбудителя.

Липосомы, попадающие в дыхательные пути в результате интратрахеального или ингаляционного введения, контактируют, главным образом, с альвеолярными макрофагами, в результате чего активность этих клеток изменяется. Описано как благотворное влияние липосом на их функциональную активность, так и фатальное — индукция апоптоза [6, 9]. Можно предполагать, что отмеченное разнонаправленное действие обусловлено составом липосом и их размерами.

Ранее нами было показано, что “пустые” липосомы (без жирнокислотного комплекса) с концентрацией липидов 1 – 2 мг/мл способны стимулировать фагоцитоз альвеолярных макрофагов до 10%, но при этом снижается количество активных макрофагов на 10 – 15 % от их общего титра [2].

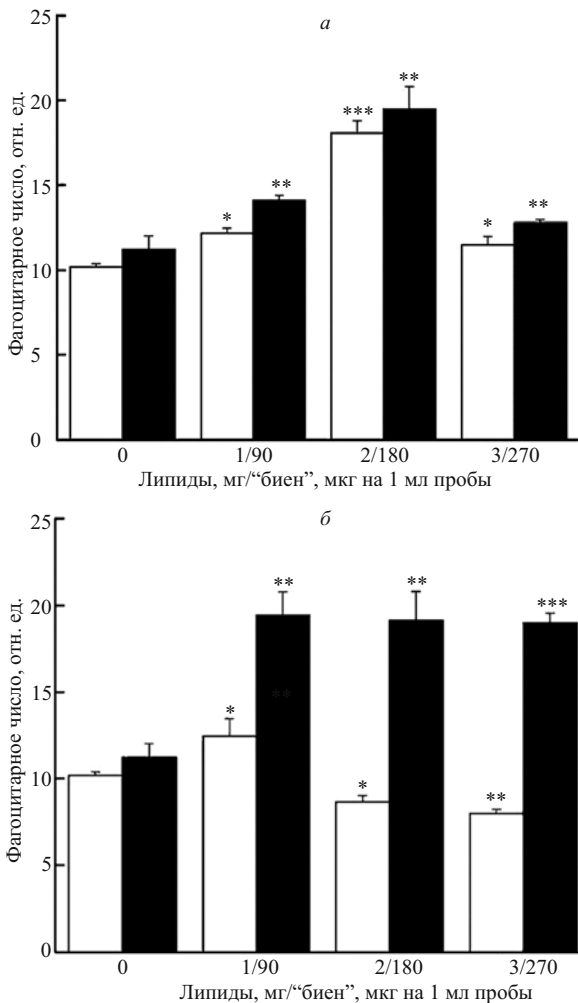
Цель работы — провести сравнительный анализ действия мульти- и униламеллярных липосом с инкорпорированным Биеном на функциональное состояние альвеолярных макрофагов *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для формирования липосом использовали яичный фосфатидилхолин (ЗАО “Биолек”, Украина), холестерин (“Reanal”, Венгрия), DL- α -токоферол (“Sigma”, США) и Биен (РУП “Белмедпрепараты”, Беларусь). В итоге липосомообразующая смесь содержала яичный фосфатидилхолин и холестерин в молярном соотношении 2:1 и антиоксидант DL- α -токоферол из расчета 0,05 мг/мг липидов, суммарная концентрация липидов составляла 25 мг/мл суспензии. Биен вносили в концентрации 0,03 мг/мг суммарных липидов.

Мультиламеллярные липосомы (МЛЛ) получали методом вортэксивирования [1]. Для получения униламеллярных липосом (УЛЛ) суспензию МЛЛ подвергали обработке ультразвуком на ультразвуковом дезинте-

¹ Лаборатория биофизики и инженерии клетки (зав. — М. А. Мартынова) ГНУ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27.



Влияние времени инкубации альвеолярных макрофагов крыс с мультиламеллярными (а) и униламеллярными липосомами (б), содержащими Биен, на фагоцитарную активность клеток (по показателю фагоцитарное число): светлые столбики — 60 мин, темные — 24 ч инкубации.

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

грагоре УЗДН-2Т (22 кГц, 20 мА) с погруженным излучателем в течение двух минут (импульсами по 30 с с односторонними интервалами между ними для охлаждения) [4]. Количественную оценку размеров липосомальных везикул проводили с использованием электронного микроскопа JEM-100CX (Япония).

Альвеолярные макрофаги крыс линии Вистар выделяли из жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Лаваж изолированных легких проводили 50 мл раствора, содержащего 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,5 мМ фосфатного буфера, 10 мМ HEPES, 6 мМ глюкозы, 0,2 мМ EGTA, pH 7,4. Лаважную жидкость фильтровали и центрифугировали 10 мин при 900 об/мин (4 °С), клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде DME (“Sigma”, США) с добавлением в нее гентамицина и пенициллина. Суспензию клеток высевали на чашки Петри в конечной концентрации $3,5 \cdot 10^5$ мак-

рофагов на чашку (камера Горяева), добавляли 3 мл среды DME, гентамицин, 300 мкл сыворотки и инкубировали 2 ч при 37 °С. Альвеолярные макрофаги выделяли из смеси альвеолярных клеток, используя их свойство прилипания к поверхности стекла, количество таких клеток достигает 98 %. Жидкую фазу аккуратно отсасывали, к альвеолярным макрофагам добавляли 3 мл свежей среды DME (без антибиотика) и липосомы. Оценивали влияние липосом как на свежeweделенные альвеолярные макрофаги (60 мин инкубации с липосомальным Биеном), так и параллельно проводили длительную инкубацию с первичной культурой альвеолярных макрофагов (24 ч совместного культивирования). С этой целью к клеткам, выделенным от одного животного ($n = 14$), добавляли липосомальный Биен в концентрации 1, 2 и 3 мг липидов на мл среды с содержанием Биена — 90, 180 и 270 мкг/мл, соответственно, с последующей инкубацией альвеолярных макрофагов в течение исследуемого времени.

Функциональную активность альвеолярных макрофагов при взаимодействии с липосомами, содержащими жирнокислотный комплекс Биен, оценивали по способности поглощать индифферентные частицы туши. В качестве показателей, характеризующих поглотительную способность макрофагов, определяли фагоцитарный показатель — процент фагоцитирующих клеток от общего числа макрофагов и фагоцитарное число — среднее количество частиц туши, поглощенных одним активным макрофагом (в отн. ед.) [5].

Результаты опытов обрабатывали статистически с вычислением средней арифметической, стандартного отклонения и достоверности различий (p) по критерию Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фагоцитарная активность свежeweделенных макрофагов существенно повышалась после 60-минутной инкубации клеток с МЛЛ, содержащими Биен (рисунок, а). Это влияние носило концентрационный характер, и максимальная стимуляция фагоцитоза — 77,5 %, $p < 0,001$ — по сравнению с контролем, где липосомы отсутствовали, достигалась при внесении липосомального Биена в клеточную суспензию в концентрации 2 мг липидов/мл. Более высокая концентрация липосомального Биена (3 мг липидов/мл) хотя и приводила, по-прежнему, к увеличению способности отдельных активных макрофагов поглощать чужеродные частицы на 12,7 % ($p < 0,05$), но абсолютный уровень ее был несколько ниже, чем в случае внесения МЛЛ в концентрации 1 – 2 мг липидов/мл. В то же время доля фагоцитирующих клеток от общего числа альвеолярных макрофагов в присутствии исследуемых концентраций липосом менялась незначительно (табл. 1).

Аналогичное увеличение фагоцитарного числа (от 13,8 до 73,3 %, $p < 0,01$) наблюдали и при длительной инкубации (24 ч) мультиламеллярных липосом с клет-

ками, но при этом несколько сокращалось число макрофагов, способных к фагоцитозу чужеродных частиц до 11,2 %, $p < 0,01$.

Иную картину наблюдали при инкубации альвеолярных макрофагов с УЛЛ, содержащими Биен (рисунк, б). Обнаружено, что при внесении в суспензию свежeweыделенных клеток липосомального комплекса жирных кислот в концентрации 1 мг суммарных липидов на 1 мл среды повышается способность альвеолярных макрофагов поглощать чужеродные частицы на 22,4 %, по сравнению с контролем ($p < 0,05$), при этом и число активных альвеолярных макрофагов незначительно возрастает. Дальнейшее повышение концентрации липосомального Биена вызывает подавление фагоцитоза на 15,1 – 21,4 % ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно). При длительной инкубации липосом (24 ч) с первичной культурой альвеолярных макрофагов картина меняется: фагоцитарное число возрастает на 68,8 – 72,8 %, по сравнению с контролем ($p = 0,01 – 0,001$). Следует отметить, что во всех исследуемых образцах присутствие липосомального Биена в концентрации 2 – 3 мг липидов/мл вызывало некоторое снижение числа активных альвеолярных макрофагов, как свежeweыделенных, так и в первичной культуре (см. табл. 1).

Как известно, механизм проникновения липосом в клетку определяется размером везикул, который, в свою очередь, зависит от состава липосомообразующей смеси и способа получения липосом [7, 8]. Малые липосомы (25 – 40 нм) более длительно циркулируют в крови и подвергаются эндоцитозу в незначительном

количестве, тогда как крупные везикулы (более 100 нм) быстро захватываются макрофагами и для них эндоцитоз — один из основных путей проникновения в клетку.

В наших экспериментах варьировали методы формирования липосом, остальные условия были идентичны. Полученные липосомы различались по размеру (табл. 2) и количеству липидных слоев в мембране. Около 70 % мультиламеллярных липосом с инкапсулированным жирнокислотным комплексом имели размеры более 0,1 мкм.

Эффект повышения фагоцитарной активности клеток под влиянием МЛЛ с инкорпорированным Биеном развивается достаточно быстро (в течение 60 мин совместного культивирования), в дальнейшем он сохраняется и не претерпевает существенных изменений. В то же время основная часть униламеллярных липосом, содержащих комплекс ненасыщенных жирных кислот, имеет размеры до 0,1 мкм, поэтому эффекты, которые они вызывают в клетках, пролонгированы во времени.

Способом получения липосом можно объяснить и концентрационный характер влияния липосомального Биена на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов. Поскольку липосомы, полученные методом ультразвуковой обработки, состоят, преимущественно, из одного липидного бислоя, а методом ворт-экспирования — из нескольких слоев (а возможно и десятков), в которые встраивается Биен, то, очевидно, что, попадая в клетки, УЛЛ под действием ферментов быстрее высвобождают жирнокислотный комплекс, чем МЛЛ. Поэтому наибольшая стимуляция фагоци-

Таблица 1. Зависимость фагоцитарного показателя свежeweыделенных альвеолярных макрофагов (АМ) и их первичной культуры от времени инкубации с липосомами, содержащими Биен ($M \pm m$)

Исследуемые образцы	Липиды, мг/мл пробы	Биен, мкг/мл пробы	Фагоцитарный показатель, %	
			60 мин	24 ч
Контроль (АМ)	–	–	93,6 ± 1,7 $n = 10$	91,7 ± 0,1 $n = 10$
АМ + МЛЛ, содержащие Биен	1	90	94,4 ± 2,1 $n = 12$	86,5 ± 5,0 $n = 7$
	2	180	99,3 ± 0,4** $n = 10$	88,3 ± 2,9* $n = 11$
	3	270	92,5 ± 1,8 $n = 10$	86,2 ± 0,7*** $n = 16$
АМ + УЛЛ, содержащие Биен	1	90	95,8 ± 2,8* $n = 6$	95,5 ± 6,4 $n = 6$
	2	180	89,9 ± 3,4 $n = 6$	90,0 ± 1,4* $n = 8$
	3	270	89,2 ± 3,6* $n = 10$	84,5 ± 4,9* $n = 10$

Примечание. МЛЛ — мультиламеллярные липосомы, УЛЛ — униламеллярные липосомы. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Диаметр липосомальной формы Биена в зависимости от метода формирования липосом

Метод получения липосом	Тип липосом	Распределение липосомального Биена по размерам, %				
		Диаметр липосом, мкм				
		< 0,05	0,05 – 0,1	0,1 – 0,5	0,5 – 1,0	> 1,0
УЗ-диспергирование	УЛЛ	69,5	18,5	11,0	1,0	–
Вортэкспирование	МЛЛ	8,2	22,8	56,3	11,4	1,3

Примечание. МЛЛ — мультиламеллярные липосомы, УЛЛ — униламеллярные липосомы.

тарной активности альвеолярных макрофагов наблюдается при внесении в клеточную суспензию крыс УЛЛ с инкорпорированным Биеном в концентрации суммарных липидов 1 мг липидов/мл и Биена 90 мкг/мл и МЛЛ в концентрации 2 мг липидов и, соответственно, 180 мкг Биена на мл среды.

ВЫВОД

Мультиламеллярные липосомы с инкорпорированным Биеном в концентрации 2 мг липидов /мл и с содержанием активного вещества — 180 мкг/мл, и униламеллярные липосомы в концентрации 1 мг липидов и, соответственно, 90 мкг Биена на 1 мл среды, повышают способность свежесыведенных альвеолярных макрофагов и первичной культуры этих клеток поглощать чужеродные частицы, фагоцитарный показатель при этом повышается незначительно. Число липидных слоев в лекарственной форме определяет динамику развития фармакологического эффекта — униламеллярные липосомы с инкорпорированным Биеном отличаются пролонгированным действием.

INFLUENCE OF UNILAYERED AND MULTILAYERED LIPOSOMES CONTAINING FATTY-ACID COMPLEX BIEN UPON PHAGOCYTE ACTIVITY IN RAT ALVEOLAR MACROPHAGES

I. M. Bushmakina, M. A. Martynova, and E. V. Knyazeva

Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Akademicheskaya 27, Minsk, 220072, Belarus

The phagocyte activity of rat alveolar macrophages and their primary culture under the interaction with liposomes containing unsaturated fatty acid complex Bien has been studied *in vitro*. Quantitative dependence of the phagocyte number and phagocyte factor on the liposomal Bien concentration were estimated. Comparative analysis of the effects of multilayered and unilayered liposomes with Bien upon cell suspension has been carried out.

Keywords: Bien complex; multilayered liposomes; unilayered liposomes; alveolar macrophages; phagocyte activity

ЛИТЕРАТУРА

1. И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, М. А. Мартынова, *Биомедицинская химия*, **55**(2), 177 – 184 (2009).
2. И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, М. А. Мартынова, *Бюл. exper. биол.*, **147**(8), 170 – 172 (2009).
3. Л. Н. Дедова, И. Н. Федорова, *Бел. мед. журн.*, № 15, 46 – 49 (2006).
4. Н. И. Дроздова, И. М. Бушмакина, *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем*, Минск (2008).
5. Е. М. Лобанова, А. Д. Таганович, *Белорусский медицинский журнал*, **11**(1), 66 – 68 (2005).
6. О. К. Поздеев, *Медицинская микробиология*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2007).
7. К. Х. Ngo, Н. Umakoshi, Т. Shimanouchi, R. Kuboi, *Colloids Surf B Biointerfaces*, **73**(2), 399 – 407 (2009).
8. M. S. Martina, V. Nicolas, C. Wilhelm, et al., *Biomaterials*, **28**(28), 4143 – 4153 (2007).
9. K. Hirota, *J. Control Release*, **119**(1), 69 – 71 (2007).

Поступила 12.03.13