

© Коллектив авторов, 2006

М. В. Жукова, М. А. Кисель, Б. Б. Кузьмицкий, А. Е. Машкович, В. М. Насек, О. В. Романенко, С. Г. Спивак

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА В ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛ. I. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ЖИДКО-КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ЛИПОСОМ

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

Изучено влияние анионного фосфатидилэтанола на степень включения доксорубина в жидкокристаллические липосомы, состоящие из соевого фосфатидилхолина. Показано, что при мольном соотношении фосфатидилхолин/фосфатидилэтанол = 3:2 в липосомы включается более, чем 90 % доксорубина при его концентрации до 130 мкг/мг суммарного фосфолипида. Определен радиус Стокса доксорубин-содержащих липосом, составляющий около 160 Å. Полученные липосомальные формы доксорубина по степени ингибирования роста солидной карциномы Эрлиха мышей значительно уступают обычному антибиотику.

Клиническое применение противоопухолевого антибиотика доксорубина ограничивается его высокой токсичностью. Вместе с тем, токсические реакции снижаются при введении доксорубина в виде липосомальной формы [1 – 3].

Одной из проблем на стадии разработки липосомальных форм доксорубина является эффективность инкапсулирования антибиотика в липосомы. Ранее было показано, что высокая степень инкапсулирования доксорубина достигается при использовании липосом, обладающих трансмембранным градиентом pH [4] или содержащих отрицательно заряженные (анионные) фосфолипиды, в частности кардиолипиды [5]. Однако этот фосфолипид проявляет антигенные свойства, что при введении липосом может приводить к их повреждению антикардиолипиновыми антителами, которые присутствуют в крови онкологических больных [6].

В качестве анионного фосфолипида для формирования липосом, содержащих доксорубин, может быть использован отрицательно заряженный фосфатидилэтанол (ФЭТ). Ранее было показано, что при включении ФЭТ в состав липосом существенно повышается степень инкапсулирования инсулина и антибиотиков [7 – 9]. ФЭТ был обнаружен в мембранах животных, получавших вместе с водой этиловый спирт [10]. Это обстоятельство позволяет причислить ФЭТ к семейству эндогенных фосфолипидов и предположить его участие в реакциях обмена липидов по обычным путям липидного метаболизма.

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффективности инкапсулирования доксорубина в липосомы, содержащие ФЭТ, а также противоопухолевой активности полученных липосом.

Для формирования липосом использовали смесь фосфатидилхолина (ФХ) из соевых бобов и ФЭТ, полученного из ФХ с помощью фосфолипазы D. Высокая степень ненасыщенности этих липидов обуславливает

жидкокристаллическое состояние бислоистой липосомальной мембраны при температуре выше 0 °С.

Как видно из рис. 1, а, только около 6 % доксорубина встраивается в липосомы, сформированные из одного ФХ. Включение в состав липидной композиции ФЭТ существенно изменяет картину: количество встроенного в липосомы антибиотика растет с увеличением доли ФЭТ в фосфолипидной смеси и достигает максимума при соотношении ФЭТ/ФХ = 2:3. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что степень включения доксорубина в липосомы в первую очередь определяется электростатическими взаимодействиями антибиотика с фосфолипидами. Замена лактозы NaCl (рис. 1, б) приводит к уменьшению количества связанного с липосомами доксорубина, а при высоких соотношениях ФЭТ/ФХ в присутствии NaCl антибиотик не включается в липосомы.

Из кривой, представленной на рис. 2, видно, что липосомы из 1 мг суммарного фосфолипида ФЭТ/ФХ (2:3) способны включать до 130 мкг антибиотика практически количественно. Дальнейшее увеличение количества добавляемого доксорубина сопровождается уменьшением степени встраивания, и существенная доля лекарственного соединения остается свободной.

Из данных гель-проникающей хроматографии установлено, что кажущаяся молекулярная масса липосом соответствует молекулярной массе глобулярного белка, равной 1660 кДа. Исходя из этого значения, определен радиус Стокса липосомального доксорубина, равный 158 ± 12 Å. Такой радиус является характерным для маленьких одноламеллярных липосом, образующихся при действии на фосфолипидные дисперсии ультразвука [11].

Для проведения биологических испытаний были получены 2 препарата липосом. Оба препарата содержали доксорубин, ФХ, ФЭТ и α -D-токоферол в весовом соотношении 10:60:40:1, при этом один из них был стериль-

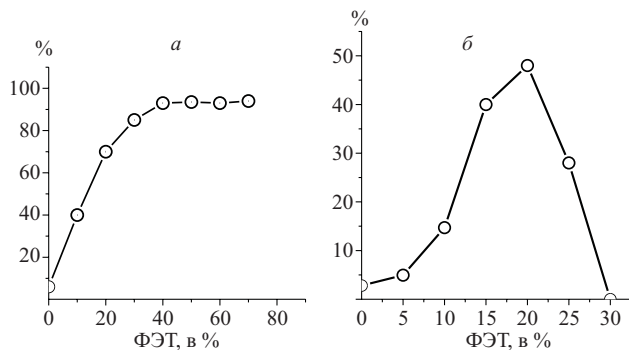


Рис. 1. Зависимость инкапсулирования доксорубицина в липосомы от соотношения фосфатидилэтанола и фосфатидилхолина. Содержание фосфолипидов — 1 мг, α -D-токоферола — 10 мкг. Антибиотик (100 мкг) добавляли в растворах: (а) лактозы (весовое соотношение лактоза:доксорубицин = 6:1); (б) 0,15 М хлорида натрия

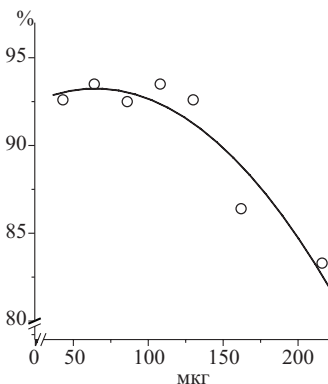


Рис. 2. Зависимость инкапсулирования доксорубицина в липосомы из фосфатидилэтанола и фосфатидилхолина (3:2) от количества добавленного антибиотика. Содержание фосфолипидов — 1 мг, α -D-токоферола — 10 мкг. Антибиотик добавляли в растворе лактозы (весовое соотношение лактоза:доксорубицин = 6:1)

чески стабилизирован ганглиозидом GM_1 , содержание которого составляло 5 вес. % относительно суммарного липида (GM_1 -липосомы). Известно, что полисахаридная полярная группа ганглиозида, выступающая над плоскостью бислоя препятствует захвату липосом ретикуло-эндотелиальной системой, что обеспечивает их более длительную циркуляцию в кровеносном русле [12].

Как видно из данных, приведенных в таблице, доксорубицин, инкапсулированный в жидкокристаллические липосомы и GM -липосомы, существенно уступает обычному препарату по противоопухолевой эффективности.

Экспериментальная химическая часть

В экспериментах использовали доксорубицин фирмы "Synbias Pharma Ltd" (Донецк, Украина). ТСХ проводили на пластинках SIL G-25 ("Macherey-Nagel", Германия) в системе растворителей хлороформ – метанол – 7 н. NH_4OH (13:5:1; об.). Липиды на хроматограммах обнаруживали с помощью молибдатного реагента [13] и раствора H_2SO_4 в метаноле с последующим нагреванием пластинок до 180 °С. Спектры поглощения записывали на приборе Specord M400.

ФХ получали из лецитина соевых бобов Epikuron 200 ("Lucas Meyer", США), содержащего по данным фирмы-производителя 92 % ФХ. Раствор 2,5 г лецитина в хлороформе наносили на колонку, заполненную окисью

алюминия (100 г). Элюирование проводили деаэрированными растворителями: хлороформом (100 мл), смесью хлороформ – метанол (9:1, 200 мл) и смесью хлороформ – метанол (4:1, 200 мл). Фракции, содержащие ФХ, отбирали и упаривали на роторном испарителе под аргоном. Выход хроматографически чистого ФХ — 1,7 г (74 %). R_f 0,35.

ФЭТ получали из ФХ с помощью фосфолипазы D [7]. Очистку ФЭТ осуществляли с помощью флэш-хроматографии экстракта реакционной смеси на силикагеле в системе растворителей хлороформ – метанол – 7 н. NH_4OH (13:5:1). Фракции, содержащие ФЭТ, подкисляли при 0 °С в делительной воронке 0,5 объемами 1 н. HCl , воронку встряхивали, нижний слой отделяли и промывали 0,5 объемами 1 М водного раствора $NaCl$. Нижний слой отделяли и растворитель упаривали. Выход ФЭТ (Na^+ -форма) около 60 %. R_f 0,8.

Ганглиозид GM_1 был выделен из мозга крупного рогатого скота в соответствии с методикой, описанной в монографии [14].

Липосомальную форму доксорубицина получали следующим образом. В круглодонную колбу, содержащую пленку фосфолипидов, образовавшуюся после упаривания хлороформа из раствора липидов на роторном испарителе в токе аргона, добавляли необходимый объем раствора доксорубицина в растворе лактозы или

Влияние обычного и инкапсулированного в липосомы доксорубицина на торможение роста солидной опухоли Эрлиха у аутбредных мышей ICR

Группа животных	Показатели торможения роста опухоли после окончания лечения ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)			
	через 1 сут.		через 7 сут.	
	Средний объем опухоли	ТРО, p^*	Средний объем опухоли	ТРО, p^*
Контроль	60,17 ± 8,14	—	112,04 ± 5,12	—
Доксорубицин, инкапсулированный в жидкокристаллические липосомы	56,11 ± 4,12	7 %, > 0,05	102,18 ± 4,06	9 %, > 0,05
Доксорубицин обычный	32,17 ± 2,34	47 %, < 0,05	61,12 ± 3,18	50 %, < 0,01
Контроль	59,38 ± 3,98	—	104,3 ± 11,16	—
Доксорубицин, инкапсулированный в GM_1 -липосомы	45,97 ± 7,87	23 %, > 0,05	73,4 ± 10,03	29 %, > 0,05
Доксорубицин обычный	27,05 ± 4,05	55 %, < 0,001	46,94 ± 13,18	53 %, < 0,01

* уровни достоверности по сравнению с контролем.

NaCl, через 10 мин смесь интенсивно встряхивали до полного диспергирования фосфолипида. Затем дисперсию обрабатывали ультразвуком (мощность 0,5 Вт, частота 22 кГц) на дезинтеграторе УЗДН-1 под аргоном два раза по 30 с. Для определения степени инкапсулирования антибиотика в липосомы свободный и липосомальный доxorубин разделяли с помощью гель-проникающей хроматографии на микроколонках, заполненных акрилексом Р60. Для этого акрилекс Р60 оставляли набухать в растворе лактозы или NaCl в течение 24 ч. Затем заполняли колонки набухшим сорбентом (гелем) и центрифугировали в течение 9 мин при 1000 об/мин с целью удаления избыточного объема раствора. Липосомы наносили на поверхность геля, колонки помещали в центрифужные стаканы и центрифугировали в течение 30 мин при 1000 об/мин. Затем добавили такой же объем раствора лактозы или NaCl и снова центрифугировали при 1500 об/мин в течение 1 мин. Липосомы выходили в свободном объеме колонки, тогда как свободный доxorубин прочно связывался с гелем. Для того чтобы измерить количество инкапсулированного доxorубина, к липосомам добавляли 10 %-ный раствор тритона X-100 до конечной концентрации 1 % и определяли оптическую плотность полученного раствора при 495 нм. Концентрацию антибиотика рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $\varepsilon = 11800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Содержание фосфолипидов в липосомах определяли согласно [13]. Гидродинамический радиус липосом рассчитывали по данным гель-проникающей хроматографии на сефарозе 2В, используя для построения калибровочной кривой глобулярные белки с известным радиусом Стокса — альдолазу (48,1 Å), каталазу (52,2 Å), ферритин (61,0 Å) и тиреоглобулин (85,0 Å).

Экспериментальная биологическая часть

Противоопухолевую эффективность доxorубина, встроенного в липосомы, изучали на модели солидной карциномы Эрлиха в прямом параллельном сравнении с обычной формой препарата. Эксперименты выполнены на аутбредных мышцах ICR обоего пола. В каждую серию опытов брали животных одного пола. Животных рандомизировали и формировали группы. В каждую группу брали от 7 до 10 особей. Контрольная группа включала 12 – 15 животных. Животным всех сформированных групп подкожно имплантировали опухолевые клетки асцитной карциномы Эрлиха. Группа животных негативного контроля оставалась без лечения. Этим мышам вводили адекватное по объему количество растворителя. Животным позитивного контроля инъецировали раствор обычного доxorубина, животным опытных

групп вводили одну из форм липосомального доxorубина. Липосомальный и обычный доxorубин вводили из расчета 4 мг/кг (по доxorубину) внутривенно двукратно через 120 ч.

Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) через 1 и 7 сут после окончания лечения. ТРО вычисляли по формуле [15]:

$$\text{ТРО} = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100\%,$$

где V — средний объем опухоли (mm^3) в опытной и контрольной группах соответственно на конкретный срок.

Сравнение результатов экспериментов проводили параметрическим методом Стьюдента-Фишера (критерий t , доверительный интервал). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Каплун, Ле Банг Шон, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец, *Вопр. мед. хим.*, № 1, 3 – 12 (1999).
2. Н. А. Оборотова, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(4), 32 – 38 (2001).
3. Н. А. Оборотова, А. Ю. Барышников, *Усп. совр. биол.*, **121**(5), 464 – 474 (2001).
4. L. D. Mayer, M. B. Bally, and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **857**(1), 123 – 126 (1986).
5. A. R. Thierry, A. Rahman, and A. Dritschilo, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**(1), 84 – 88 (1994).
6. J. V. Armas, J. Dantas, D. Mendonca, et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, **18**(2), 227 – 232 (2000).
7. А. А. Ахрем, А. П. Власов, М. С. Воробьев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **28**(10), 34 – 37 (1994).
8. В. Ю. Давыдов, Л. Н. Кулик, М. А. Кисель, *Антибиотики и химиотерапия*, **41**(5), 25 – 29 (1996).
9. М. А. Кисель, Л. Н. Кулик, I. S. Tsybovsky, et al., *Int. J. Pharm.*, **216**(1 – 2), 105 – 114 (2001).
10. C. Alling, L. Gustavsson, J.-E. Mansson, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **793**(1), 119 – 122 (1984).
11. F. Szoka and D. Papahadjopoulos, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 467 – 508 (1980).
12. S. Unezaki, K. Maruyama, O. Ishida, et al., *J. Drug Target.*, **1**(4), 287 – 292 (1993).
13. V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, and I. M. Vasendin, *J. Chromatogr.*, **114**(1), 129 – 141 (1975).
14. Л. Д. Бергельсон (ред.), *Препаративная биохимия липидов*, Наука, Москва (1981); L. D. Bergelson (ed.), *Lipid biochemical preparations*, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford (1980).
15. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2000).

Поступила 11.08.04

ENCAPSULATION OF DOXORUBICIN IN LIPOSOMES CONTAINING PHOSPHATIDYLETHANOL. PART I: PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTITUMOR ACTIVITY OF LIQUID-CRYSTALLINE LIPOSOMES

M. V. Zhukova, M. A. Kisel', B. B. Kuz'mitskii, A. E. Mashkovich, V. M. Nasek, O. V. Romanenko, and S. G. Spivak

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

The effect of anionic phosphatidylethanol on the incorporation of doxorubicin into liquid-crystalline liposomes consisting of soybean phosphatidylcholine was studied. Over 90% of doxorubicin are encapsulated in liposomes in the case of a 3 : 2 phosphatidylcholine – phosphatidylethanol molar ratio, with a doxorubicin concentration reaching 130 $\mu\text{g}/(\text{mg}$ of total phospholipids). The Stokes radius of the doxorubicin-containing liposomes was found to be about 160 Å. In terms of the ability to inhibit solid Ehrlich carcinoma in mice, the obtained liposome formulations of doxorubicin were much less effective in comparison to the usual antibiotic.