

слідною групою і групою, де для лікування використали 10%-ну метилурацилову мазь.

### Висновки

Можна констатувати, що запропонована композиційна суміш похідних  $\gamma$ -кроднолактону та Zn-карнозину має виразні антиексудативні властивостями та впливає на різні патофізіологічні ланки запального процесу в м'яких тканинах.

Протизапальний механізм дії композиційної суміші здебільшого пов'язаний із впливом на циклогеназний комплекс метаболізму арахідонової кислоти. Завдяки виразним антиоксидантним властивостям, композиційна суміш дозволяє посилити нейтралізацію вільнорадикальних продуктів перекисного окиснення ліпідів клітинних оболонок, які особливий синергізм виявляють із такими медіаторами запалення, як простагландини.

Саме у фазі дії простагландинів спостерігалася найбільша антиексудативна активність, яка сягала 31,39 %. Дещо нижчою (23,4 %) ця активність була в попередньому періоді, коли

головну роль у розвитку запалення відіграють кініні. Також можна констатувати відсутність протизапального ефекту у композиційної суміші в початковому періоді на момент дії таких медіаторів, як гістамін і серотонін.

Встановлено, що досліджувана композиційна суміш також не впливає на ліпоксигеназний комплекс метаболізму арахідонової кислоти, продуктами якого є такі фактори, як лейкотрієни.

Виявлено, що запропонована композиційна суміш суттєво впливає на стійкість клітинних мембран, інгібуючи їхню деструкцію. Антиексудативна активність цього протинабрякового компонента сягає 24,69 %.

У порівняльному аспекті отримані експериментальні дані дозволяють стверджувати, що досліджувана композиційна суміш має не менші, а у наведених вище періодах розвитку запалення — більші антиексудативні властивості, як такі сучасні фармакологічні засоби для лікування ранового процесу, як 10%-на метилурацилова мазь і мазь «Офлакаїн-Дарниця».

### ЛІТЕРАТУРА

1. Відомча інструкція: Сучасне медикаментозне лікування ран. — Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи АМН України / під ред. О. О. Шалімова. — К., 2002. — 35 с.

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.

3. Патент України на корисну модель № 22612, МПК (2006), А61К 31/19 (2007.01), А61К 31/34, А61Р 31/00; Пастернак Ю. Б., Огоновський Р. З., Регада М. С. та ін. — № u 2006 12726; Заявл. 04.12.2006; Опубл. 25.04.2007. — Бюл. № 5. — 4 с.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-кор. РАМН, проф. Р. У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина»», 2005. — 832 с.

5. Di Rosa M. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine / M. Di Rosa, J. P. Giroud, D. A. Willoughby // J. Patol. — 1971. — Vol. 104, N 15. — P. 29.

6. Gado K. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs / K. Gado, G. Giger // Agent and Actions. — 1991. — Vol. 32, N 1-2. — P. 119-121.

7. Wauwe van J. P. Arabinogalactan- and dextran- induced ear inflammation in mice / van Wauwe J. P., J. G. Goossens // Agents and Actions. — 1989. — Vol. 28, N 1-2. — P. 78-82.

УДК 615.015.032.415.234.001.6

О. В. Паршиков, О. В. Стефанов

## НАГРОМАДЖЕННЯ В ОРГАНАХ І ТКАНИННИХ МАКРОФАГАХ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ГЛЮКОЗАМІНІЛМУРАМІЛДИПЕПТИДУ ПРИ ВНУТРІШНЬОВЕННОМУ ВВЕДЕННІ МИШАМ

Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

У розробках препаратів для імунотерапії злоякісних пухлин значну увагу приділяють ліпосомальним засобам керованої доставки імунотропних агентів в органи ретикулоендотеліальної системи,

де відбуваються ключові етапи диференціації й активації клітин-ефекторів неспецифічної протипухлинної резистентності [1]. Серед відомих сьогодні переважно ліпофільних похідних мурамідипептиду,

що впроваджуються для застосування в лікуванні метастатичних уражень печінки та легенів [2; 3], великий інтерес викликає водорозчинний аналог глюкозамінілмурамідипептиду (ГМДП), який вирізняється ши-



роким спектром біологічної активності [4].

Як свідчать попередні дослідження, ГМДП у ліпосомах пригнічує метастазування та модулює функціональну активність макрофагів у мишей з експериментальними пухлинами [5]. Проте особливості фармакокінетики і питання оптимізації та стабільності ліпосомальної форми пептиду залишаються не з'ясованими.

**Мета** роботи — дослідження нагромадження в органах-мішенях і тканинних макрофагах ГМДП у фосфатидилхолінових ліпосомах після внутрішньовенного введення здоровим мишам.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на мишах-самцях масою 18–20 г лінії C57BL/6, утримуваних у стандартних умовах. Тваринам одноразово вводили в ретроорбітальний венозний синус ГМДП у ліпосомах середнього розміру (багатошарові ліпосоми з середнім розміром 500 нм — від 200 до 800 нм) у фізіологічному розчині (0,9%-й NaCl). Тварин декапітували через 5 хв і 0,5; 1; 2; 6 год після введення під легким ефірним наркозом, дотримуючись положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Процедура приготування ліпосом з ячного фосфатидилхоліну (ЯФХ) та завантаження їх ГМДП (ліпід/пептид, 50:1 за вагою) містила спонтанну везикуляцію ліпідних плівок у фізіологічному розчині, заморожування-розморожування (3 цикли) й обробку ультразвуком (2 хв, Fisher M 300, США) згідно з методом [6].

Макрофаги з легень і селезінки мишей виділяли шляхом адгезії до пластику (1 год) після інкубації гомогенату тканин у чашках Петрі (35 мм, Corning, США) при 37 °С у середовищі RPMI 1640 із 5%-ї ембріональ-

ної сироватки корів (Sigma, США). Купферовські клітини з печінки виділяли за методом [7]. Білок у зразках визначали за методом Лоурі [8].

Для спостереження за стабільністю та розподілом в органах і клітинах ліпосомального ГМДП використовували метод подвійної ізотопної мітки. Радіоактивну похідну ГМДП-<sup>125</sup>I, синтезовану за методом [9], додавали до нерадіоактивного пептиду при відтворенні загальної дози (50 мкг/кг,  $1 \cdot 10^7$  імп/хв/кг). До складу ліпосом із ЯФХ додавали холестеринолеат-<sup>14</sup>C (ХО-<sup>14</sup>C, Amersham, Англія) як ліпідну мітку ( $1 \cdot 10^6$  імп/хв/кг відповідно).

Зразки біологічних тканин розчиняли та знебарвлювали шляхом інкубації при 54 °С у суміші сольобілізатора Protosol (NEN, США) та перекису бензоїлу (Koch-Light, Англія) і переносили у флакони з сцинтиляційною рідиною ЖС 107 (Росія). Вимірювання радіоактивності підготовлених зразків тканин і клітин проводили на рідинному сцинтиляційному β-лічильнику РакБета 1219 «Спектрал» (Turku, Фінляндія) в режимі одночасної реєстрації у двох діапазонах енергетичного спектра («вікнах» для <sup>14</sup>C та <sup>3</sup>H) з урахуванням гасіння зовнішнього стандарту [10].

У роботі використовували ячний фосфатидилхолін (ЗАТ «Біолек», Харків). Синтетичний ГМДП і похідні для синтезу ГМДП-<sup>125</sup>I були надані Т. М. Андронову (Інститут біоорганічної хімії ім. М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчинникова РАН, Москва).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.1 і MS Excel.

### Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження наявності радіоактивної речовини (ліпідної та пептидної мітки, співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I) у крові мишей після одноразового внутрішньовенного введення

ГМДП-<sup>125</sup>I в ЯФХ ліпосомах-<sup>14</sup>C представлені в табл. 1. Уже на 5-й хвилині після введення питомий вміст ліпідної мітки — (33,0±4,2) % дози/мл — був більшим за такий для пептидної мітки — (12,4±2,5) % дози/мл. Рівень наявності радіоактивної речовини зі складу мембрани ліпосом (30–40 % дози/мл) залишався відносно сталим протягом 60 хв, а потім знижувався в 2–3 рази. Водночас вміст пептидної мітки невинно знижувався, а співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I сягало 10,3 через 6 год. Принципові відмінності в термінах розподілу і виведення ліпідної та пептидної мітки вказують на загальну тенденцію до прискореної елімінації з крові пептиду (ГМДП-<sup>125</sup>I та метаболітів) порівняно з його ліпосомальним носієм.

Відкладені зміни рівня ліпідної мітки в кровотоці на фоні зменшення вмісту пептидної мітки доцільно розглядати як наслідки тимчасової затримки та структурної трансформації ліпосом в органах-мішенях [1]. На підтвердження цього припущення свідчать дані, подані в табл. 2, щодо розподілу ліпідної та пептидної мітки в легенях, селезінці та печінці тварин після одноразового внутрішньовенного введення ГМДП-<sup>125</sup>I в ЯФХ ліпосомах-<sup>14</sup>C.

Таблиця 1  
Зміни питомого вмісту ГМДП-<sup>125</sup>I та ЯФХ ліпосом-<sup>14</sup>C у крові мишей після одноразового внутрішньовенного введення, % від введеної дози/мл,  $M \pm m$ ,  $n = 6-8$

Час після введення, хв	Вміст пептидної мітки, ГМДП- <sup>125</sup> I	Вміст ліпідної мітки, ХО- <sup>14</sup> C	Співвідношення, <sup>14</sup> C/ <sup>125</sup> I
5	12,4±2,5	33,0±4,2	2,7
30	10,8±2,8	42,2±5,8	3,9
60	8,0±1,6	34,8±3,4	4,4
120	2,9±0,3	12,8±2,6	4,4
360	1,2±0,3	12,7±2,3	10,3



Таблиця 2  
Розподіл в органах мишей  
ГМДП-<sup>125</sup>I в ЯФХ  
ліпосомах-<sup>14</sup>C,  
% від введеної дози/г,  
M±m, n = 6–8

Час після введення, хв	Вміст пептидної мітки, ГМДП- <sup>125</sup> I	Вміст ліпідної мітки, ХО- <sup>14</sup> C	Співвідношення, <sup>14</sup> C/ <sup>125</sup> I
Легені			
5	21,7±1,6	12,9±1,3	0,6
30	5,2±0,4	11,2±1,2	2,1
60	4,3±0,3	9,5±1,2	2,2
120	4,4±0,3	9,2±0,8	2,1
360	1,2±0,2	7,0±0,6	5,6
Селезінка			
5	69,6±5,3	12,0±6,1	0,2
30	21,2±2,4	18,8±2,7	0,9
60	24,3±2,5	25,2±3,4	1,0
120	20,4±5,6	20,2±2,7	1,0
360	5,8±0,7	8,8±0,7	1,5
Печінка			
5	50,9±6,2	60,3±7,4	1,2
30	17,9±2,2	42,3±3,1	2,4
60	11,1±1,4	32,1±2,6	2,9
120	12,1±2,9	30,7±5,2	2,5
360	4,7±0,3	25,3±2,3	5,4

У легенях на 5-й хвилині після введення питомий вміст пептидної мітки — (21,7±1,6) % дози/г — вірогідно перевищував рівень ліпідної мітки — (12,9±1,3) % дози/г. В інтервалі до 120 хв наявність ліпідної мітки залишалася на відносно сталому рівні (близько 10 % дози/г), а питомий вміст пептидної мітки істотно знижувався (у 4–5 разів). Надалі, через 6 год після введення, спостерігалось помірне зниження рівня ліпідної мітки (до 7 % дози/г) та виразне падіння вмісту пептидної мітки (до 1,2 % дози/г), що відображено в зростанні співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I до 5,6.

У селезінці диспропорція в нагромадженні пептидної (69,6±5,3) % дози/г та ліпідної мітки (12,0±6,1) % дози/г на 5-й хвилині після введення була виразнішою, ніж у легенях. Вміст

ліпідної мітки через 6 год зберігався на сталому рівні, хоча поволі зростав до 60-ї хвилини — (25,2±3,4) % дози/г. Питомий вміст пептидної мітки різко знижувався на 30-й хвилині та залишався незмінним (близько 20 % дози/г) протягом 2 год. За 6 год вміст пептидної мітки в органі знижувався в 10 разів від початкового рівня, а співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I залишалося близьким до 1, відповідно, показника вихідного складу ліпосомальної форми пептиду.

У печінці найбільш масоване і рівномірне накопичення ліпідної — (60,3±7,4) % дози/г — та пептидної мітки (50,9±6,2) % дози/г спостерігалось на 5-й хвилині після введення. За 6 год вміст ліпідної мітки в органі знижувався в 2,4 разу, а рівень пептидної мітки — у 10,8 разу від початкового, що супроводжувалося відповідним зростанням співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I до 5,4.

Загалом, отримані дані вказують на те, що характер біорозподілу ліпосомального ГМДП-<sup>125</sup>I прямо залежав від стабільності носія. Диспропорційне зменшення вмісту пептидної мітки порівняно з ліпідною в крові та органах тварин може відбуватися за рахунок вивільнення пептиду з ЯФХ ліпосом, яке становить до 90 % за 6 год.

Враховуючи відмінності фармакокінетики та біологічної активності мурамілпептидів у вільному стані та ліпосомальній формі [3; 11], слід зазначити, що вивчення кінетичного профілю подвійної радіоактивної мітки дозволило спостерігати не тільки за виходом речовини з об'єму внутрішньої водної порожнини ліпосом під впливом білків крові та фагоцитів моноцитарно-макрофагальної системи [6], але й визначити особливості доступу до певних органів і клітин. Зокрема, коливання рівня нагромадження радіоактивної речовини в легенях і печінці до певної міри доповнювали картину, яка спостерігалася в крові. Водночас розподіл радіоактивної речовини в

селезінці характеризує здатність органа [12] до вибіркової затримки ліпосом, які за розміром (об'ємом) перевершували середній показник (500 нм) для гетерогенної суспензії ліпосом (від 200 до 800 нм), використуваної для введення тваринам. Тимчасова затримка в органах ліпосом із вищим вмістом ГМДП-<sup>125</sup>I відповідно спричинювала суттєве підвищення рівня наявності пептидної мітки по відношенню до ліпідної в селезінці (протягом 6 год) і легенях (5 хв).

Разом із вивченням розподілу радіоактивної речовини в органах тварин було виявлено, що питомий вміст ліпідної та пептидної мітки в ізольованих тканинних макрофагах перевищує в 5–50 разів показники для вихідних гомогенатів тканин. Результати визначення вмісту ліпідної та пептидної мітки в макрофагах із легенів, селезінки та печінки мишей, подані в табл. 3, підтверджують можливості до-

Таблиця 3  
Нагромадження  
макрофагами з легенів,  
селезінки і печінки мишей  
ГМДП-<sup>125</sup>I в ЯФХ  
ліпосомах-<sup>14</sup>C, % від введеної  
дозы/мг білка, M±m, n = 3–4

Час після введення, хв	Вміст пептидної мітки, ГМДП- <sup>125</sup> I	Вміст ліпідної мітки, ХО- <sup>14</sup> C	Співвідношення, <sup>14</sup> C/ <sup>125</sup> I
Легеневі макрофаги			
30	1,42±0,13	1,19±0,14	0,8
60	1,29±0,12	0,78±0,16	0,6
360	1,64±0,20	0,13±0,04	0,1
Селезінкові макрофаги			
30	1,03±0,08	0,62±0,07	0,6
60	1,75±0,20	0,76±0,10	0,4
360	1,16±0,14	0,39±0,05	0,3
Печінкові макрофаги			
30	0,42±0,03	0,21±0,02	0,5
60	0,65±0,05	0,38±0,02	0,6
360	0,84±0,09	0,47±0,05	0,6





ставки ГМДП-<sup>125</sup>I за допомогою ЯФХ ліпосом-<sup>14</sup>C безпосередньо в ці клітини.

У легеневиx макрофагах вміст пептидної мітки перебував на сталому рівні (близько 1,5 % дози/мг білка), а вміст ліпідної мітки з часом знижувався. У клітинах, ізольованих протягом часу від 30 хв до 6 год, співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I змінювалося від 0,8 до 0,1. У макрофагах селезінки вміст пептидної мітки також перевершував рівень ліпідної мітки, а співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I зменшувалося від 0,6 до 0,3 за 6 год. Макрофаги печінки через 30 хв після введення ліпосомально-го пептиду нагромаджували радіоактивну речовину меншою мірою, ніж клітини легенів і селезінки. З часом питомий вміст ліпідної та пептидної мітки в клітинах печінки збільшувався при сталому рівні співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I — 0,6.

Характерною особливістю процесу поглинання радіоактивної речовини тканинними макрофагами є те, що співвідношення <sup>14</sup>C/<sup>125</sup>I в клітинах переважно змінювалося в зворотному напрямку порівняно з розбіжностями в рівні наявності ліпідної та пептидної мітки, які попередньо спостерігалися в органах. Ця тенденція до нагромадження клітинами пептидної мітки узгоджується з даними про наявність у макрофагах великої кількості місць специфічного зв'язування мурамилпептидів, враховуючи цитоплазматичні PRR рецептори (pattern recognition receptors) і гістон H1 [4; 9]. З іншого боку, відносно низький рівень ліпідної мітки в макрофагах вірогідно зумовлений тим, що навантаження ліпосомальними ліпідами підвищує інтенсивність ліпідного метаболізму, пришвидшує обмін ліпідного складу мембран [7] і, відповідно, позначається на тривалості вивільнення ліпідної мітки фагоцитами.

Таким чином, затримка ЯФХ ліпосом в органах тварин і нагромадження ГМДП тканинни-

ми макрофагами створює належні передумови для розвитку захисної реакції системи неспецифічної протипухлинної резистентності, пов'язаної з активацією численних ефекторних функцій резидентних і залучених макрофагів у органах-мішенях. Тому наступним кроком на шляху до розкриття фармакологічного потенціалу запропонованої форми імуномодулятора є дослідження спільної дії ліпосом і пептиду на функціональну активність макрофагів.

## Висновки

1. При перебуванні у кровотоці та розподілі в органах мишей стабільність ЯФХ ліпосом, завантажених ГМДП-<sup>125</sup>I, поступово знижується, що може супроводжуватися виходом до 90 % пептиду з носія за 6 год.
2. Тривала затримка ліпосомального ГМДП-<sup>125</sup>I у легенях, селезінці та печінці тварин призводить до поглинання пептиду тканинними макрофагами.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors* / D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong [et al.] // *Pharmacol Rev.* — 1999. — Vol. 51 (4). — P. 691-737.
2. *Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide* / G. M. Bahr, E. Darcissac, D. Bevec [et al.] // *Int. J. Immunopharmacol.* — 1995. — Vol. 17 (2). — P. 117-131.
3. *Asano T. Liposome-encapsulated MTP-PE: a novel biologic agent for cancer therapy* / T. Asano, E. S. Kleinerman // *J. Immunother.* — 1993. — Vol. 14 (1). — P. 286-292.
4. *Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides* / E. Meshcheryakova, E. Makarov, D. Philpott [et al.] // *Vaccine.* — 2007. — Vol. 25 (23). — P. 4515-4520.
5. *Антиметастатический эффект заключенного в липосомы синтетического аналога мурамилдипептида* / В. Ю. Уманский, А. В. Стефанов, Г. В. Лось [и др.] // *Докл. Акад. наук СССР.* — 1986. — Т. 286 (2). — С. 474-476.

6. *Lasic D. D. Liposomes: from physics to applications* / D. D. Lasic. — Amsterdam : Elsevier Science Publishers B. V., 1993. — P. 347-397.

7. *Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages* / T. Decker, M. L. Lohmann-Matthes, U. Karck [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* — 1989. — Vol. 45 (2). — P. 139-146.

8. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* / O. N. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193 (1). — P. 265-275.

9. *Muramyl peptides bind specifically to rat brain membranes* / A. A. Kaydalov, Yu. N. Utkin, T. M. Andronova [et al.] // *FEBS Lett.* — 1989. — Vol. 248 (1-2). — P. 78-82.

10. *Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами* / Л. А. Остерман. — М. : Наука, 1983. — С. 198-203.

11. *ImmTher, a lipophilic disaccharide derivative of muramyl dipeptide, up-regulates specific monocyte cytokine genes and activates monocyte-mediated tumoricidal activity* / L. L. Worth, S.-F. Jia, T. An, E. S. Kleinerman // *Cancer Immunol. Immunother.* — 1999. — Vol. 48 (1). — P. 312-320.

12. *Moghimi S. M. Modulation of murine liver macrophages clearance of liposomes by diethylstilbestrol. The effect of vesicle surface charge and a role for the complement receptor Mac-1 (CD11b/CD18) of newly recruited macrophages in liposome recognition* / S. M. Moghimi, H. M. Patel // *J. Cont. Release.* — 2002. — Vol. 78 (1). — P. 55-65.

