© Коллектив авторов, 2016
УДК 618.146-006.6:615.28:616.15-018
DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2016.11011>
ISSN – 2073-8137

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИОСОМАЛЬНОГО ДОКСОРУБИЦИНА С МЕМБРАНАМИ КЛЕТОК

И. А. Базиков, В. В. Лукинова, А. Н. Мальцев, Е. И. Дискаева, С. Р. Айтекова

Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

INTERACTION NIOSOMAL DOXORUBICIN CELL MEMBRANES

Bazikov I. A., Lukinova V. V., Maltsev A. N., Diskaeva E. I., Ayteкова S. R.

Stavropol State Medical University, Russia

Изучение изменения физических и структурных свойств мембран при взаимодействии с ниосомальной формой доксорубицина показало, что встраивание ниосом увеличивает текучесть мембраны. В результате они становятся более проницаемыми для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков. Это приводит к увеличению скорости транспорта, в том числе лекарственных веществ, через мембраны в клетку, что, на наш взгляд, является одним из механизмов повышения эффективности терапевтического действия ниосомальной формы доксорубицина.

Ключевые слова: доксорубин, ниосомы, мембраны

Study of change in the physical and structural properties of the membranes in contact with niosomal form of doxorubicin showed that the incorporation of niosomes increases membrane fluidity. As a result, they are becoming more permeable to water and other small hydrophilic molecules, increasing the speed of lateral diffusion of integral proteins. This increases the speed of transport, including the drugs through cell membranes, which in our opinion, is one of the mechanisms to increase the efficiency of therapeutic action of niosomal form of doxorubicin.

Key words: doxorubicin, niosomes, membranes

Доксорубин более 30 лет используется при лечении онкологических заболеваний. Он применяется только в виде растворов для внутривенного и внутримышечного введения. Ограничением для его терапевтического использования является токсичность по отношению к здоровым тканям, в первую очередь кардиотоксичность, проявляющаяся в выраженной сердечной недостаточности. В настоящее время перспективным направлением фарминдустрии является разработка новых способов введения лекарственных средств, позволяющих снизить побочные эффекты препарата, при этом обеспечивая его направленное и пролонгированное действие [10]. Доказана эффективность использования инкапсулированных в ниосомы лекарственных веществ [1–5]. Ниосомальная форма доксорубицина позволяет антибиотику не попадать в здоровые ткани, а проникать лишь через дефектные капилляры опухоли кожи. Ниосомы за счет постепенного высвобождения поддерживают высокую концентрацию антибиотика в крови длительное время и увеличивают эффективность препарата [6]. В связи с этим актуальным является изучение механизмов повышения цитотоксичности по отношению к раковым клеткам ниосомальной формы доксорубицина.

Целью работы явилось изучение механизмов взаимодействия ниосомальной формы доксорубицина с плазматическими мембранами.

Материал и методы. Цитоплазматические мембраны получали с помощью гипотонического гемолиза с последующим их выделением посредством центрифугирования. Для этого: отмытые эритроциты кроликов помещали в гипотонический 10 мМ раствор Na-фосфатного буфера pH 7,4 в соотношении 1:10 при T=4 °C. Гемолиз эритроцитов проводили в течение 30 мин при температуре 4 °C, периодически перемешивая суспензию. По окончании гемолиза «тени» эритроцитов осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 20 000 g (14 000 об/мин). Супернатант осторожно отделяли от осадка. Осадок трижды промывали тем же буфером, переосаждая мембраны центрифугированием при 14 000 об/мин в течение 15 мин. Конечный осадок эритроцитарных мембран ресуспендировали в изотоническом 155 мМ растворе NaCl в соотношении 1:1 [11]. Концентрацию белка в исследуемых растворах мембран измеряли по Лору. Конечные рабочие концентрации пирена в растворах мембран составили 1–10 мкмоль. Изучение влияния ниосомальных форм противоопухолевого препарата на физические свойства мембран проводили следующим образом: к 2 мл суспензии мембран с концентрацией белка 0,1 мг на 1 мл при интенсивном перемешивании добавляли 10 мкл раствора пирена в этаноле и 100 мкл препарата в концентрации 5 мМ. Измерение микровязкости мембран проводили методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена. Определение

микровязкости основано на образовании эксимеров (активных димеров) пирена в липидном окружении [7]. Флюоресценцию пирена измеряли спектрофлуориметрически на спектрофлуориметре RF-5301PC (Шимадзу) (Япония). Для определения микровязкости липидного бислоя находили интенсивность флюоресценции или свечение пирена при длине волны возбуждения 334 нм, длина волны мономеров – 395 нм, длина волны эксимеров – 470 нм. Для определения микровязкости зоны липид-белковых контактов длина волны возбуждения – 286 нм, длина волны мономеров – 395 нм, длина волны эксимеров – 470 нм. Оценка микровязкости основывается на вычислении коэффициента эксимеризации пирена ($K_{\text{экс}} = F_{470}/F_{395}$), который равен отношению интенсивности флюоресценции эксимеров к интенсивности флюоресценции мономеров. Коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от микровязкости и обозначается как F_3/F_m . Рассчитывали показатель миграции энергии с триптофановых остатков белков на пирен [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью прикладных программ «Statistica» (версия 6,0) и «Excel». Экспериментальные данные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($M \pm m$), которые рассчитывали методом вариационного анализа с использованием параметрического критерия оценки достоверности (t-критерия Стьюдента).

Результаты и обсуждение. Изучение физических свойств ниосом, содержащих доксорубицин, показало, что при встраивании пирена в спектре флюоресценции наблюдается 3 пика. Первый пик в области 330–335 нм, второй в области 370–390 нм, характерный для мономерной формы пирена, и третий в области 460–470 нм, характерный для эксимера пирена – димера, состоящего из одной возбужденной и одной невозбужденной молекулы зонда (рис. 1).

Рис. 1. Спектр флуоресценции пирена в кремнийорганических ниосомах

Для определения микровязкости липидного бислоя находили интенсивность флюоресценции или свечение пирена при длине волны возбуждения 334 нм. Коэффициент эксимеризации пирена F_3/F_m (334) незначительно повышается по сравнению с интактными мембранами (табл.). Это свидетельствует о том, что липидная фаза мембран, в которой растворены молекулы зонда, сама по себе не претерпевает существенных изменений при взаимодействии с ниосомами, содержащими доксорубицин.

Таким образом, микровязкость липидного бислоя мембран при взаимодействии с ниосомальной формой доксорубицина остается в пределах физиологической нормы.

Таблица

Структурные параметры плазматических мембран при взаимодействии с ниосомальной формой доксорубицина ($M \pm m$; $n=6$)

Группа	F_3/F_m (334)	F_3/F_m (286)	Величина $(F_0 - F)/F_0$
Нативные мембраны	$0,641 \pm 0,011$	$0,936 \pm 0,052$	$0,135 \pm 0,011$
Опыт	$0,691 \pm 0,021$	$1,244 \pm 0,041^*$	$0,194 \pm 0,007^*$

* – $p < 0,05$ по сравнению с нативными мембранами.

Определение микровязкости зоны липид-белковых контактов при длине волны возбуждения 286 нм показало достоверное изменение коэффициента эксимеризации пирена F_3/F_m (286). Так как коэффициент эксимеризации пирена F_3/F_m (286) характеризует текучесть аннулярных липидов [7], полученные нами результаты указывают на более значительное снижение микровязкости в зоне белок-липидных контактов, или повышение текучести аннулярных липидов.

Исследование интенсивности безизлучательного переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен при взаимодействии с ниосомальной формой доксорубицина выявило повышение эффективности переноса энергии $(F_0 - F)/F_0$ с белков на пирен (см. табл.), что может быть следствием структурных перестроек в мембранных белках.

Таким образом, анализ показателей, свидетельствующих о состоянии микровязкости различных зон плазматических мембран, показал, что при взаимодействии инкапсулированного в ниосомы доксорубицина с мембраной наблюдается отчетливое повышение показателя миграции энергии с триптофана на пирен по сравнению с интактными мембранами. Поскольку величина эксимеризации пирена обратно пропорциональна вязкости липидной фазы, выявленное нами повышение изучаемых показателей указывает на снижение упорядоченности молекул в мембране при взаимодействии с ниосомами. Причем данные изменения наблюдаются как в интегральном липидном бислое, так и в большей степени аннулярной липидной фракции. Это приводит к повышению общей текучести мембран (табл., рис. 2).

Рис. 2. Изменение спектра флуоресценции пирена при встраивании ниосомальной формы опытного образца ниосомальной формы противоопухолевого препарата с плазматической мембраной (А – контроль, Б – опыт)

Согласно литературным данным, реакция образования эксимеров пирена лимитируется скоростью диффузии в области жирно-кислотных цепей липидов, что позволяет исследовать текучесть мембран по отношению $I_{\text{эк}}/I_m$, которое зависит от гидрофобного объема, доступного для пирена, а также от

подвижности углеводородных цепей липидов [7]. На наш взгляд, это связано с тем, что длина связи Si-O 1,6 Å в молекуле 12 диметикона, в то время как длина связи C-C в фосфолипидах мембран составляет 1,4 Å, угол связи Si-O-Si 12 диметикона составляет 130° градусов, в отличие от 109° градусов связи C-C-C в фосфолипидах. Это дает большую подвижность слоев ниосом по сравнению с бислоем мембран, образованных фосфолипидами.

Таким образом, обладая липофильностью, ниосомы легко встраиваются в жирно-кислотные цепи фосфолипидов мембран, повышая тем самым текучесть данной зоны.

Изменения стационарной флуоресценции в полсе излучения эксимеров могут быть объяснены образованием дополнительных гидрофобных зон в плазматической мембране, а также разжижением липидного бислоя, поскольку диффузионные процессы являются лимитирующим фактором образования возбужденных молекул димера (эксимера) пирена.

Известно, что эффективность образования эксимеров пирена в мембранах определяется не только текучестью, но и объемом жидкой фазы гидрофобной области фосфолипидного бислоя, в котором растворен флуоресцентный зонд [7]. Результаты исследования показывают, что встраивание

инкапсулированного в ниосомы доксорубина в мембраны приводит к снижению общей микровязкости мембран. Согласно литературным данным, при увеличении текучести мембрана становится более проницаемой для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков [8]. Если активный центр интегрального белка, осуществляющий некую функцию, располагается исключительно в гидрофильной его части, то изменение текучести липидов, вероятно, не скажется слишком сильно на активности белка. Но если белок выполняет транспортную функцию и транспортный компонент пересекает мембрану, то изменения свойств липидной фазы могут привести к значительному изменению скорости транспорта веществ через мембраны [9], что может значительно улучшить доставку лекарственных веществ в клетку.

Заключение. Взаимодействие инкапсулированного в ниосомы доксорубина с плазматическими мембранами увеличивает их текучесть, в результате чего они становятся более проницаемыми для воды и других малых гидрофильных молекул, растет скорость латеральной диффузии интегральных белков. Это приводит к увеличению скорости транспорта, в том числе и лекарственных веществ, через плазматические мембраны в клетку.

Литература

1. Базиков, И. А. Изучение нанокапсул кремнийорганической природы, используемых для трансдермальной доставки активных субстанций / И. А. Базиков, П. А. Омелянчук, Э. М. Хатков [и др.] // Вестник Российской Академии Естественных наук. – 2012. – № 1. – С. 81–83.
2. Базиков, И. А. Оценка размеров и стабильности везикул кремнийорганической природы, используемых для трансдермальной доставки активных субстанций / И. А. Базиков, В. А. Аксененко, Э. М. Хатков [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 81–82.
3. Базиков, И. А. Применение клеточных и нанотехнологий для разработки новых препаратов / И. А. Базиков, И. В. Климанович, Н. И. Пенкова [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 14–18.
4. Базиков, И. А. Способ трансдермального переноса активных субстанций с использованием ниосом на основе ПЭГ-12 диметикона Патент на изобретение RU 2539396 от 29.08.2014.
5. Базиков, И. А. Способ изготовления трансдермального пластыря, содержащего ниосомы на основе ПЭГ-12 диметикона. Патент на изобретение RU 2539397 от 22.10.2014.

References

1. Bazikov I. A., Omelyanchuk P. A., Hatkov E. M., Ghukasyan A. L., Seiranidu Z. A. *Vestnik Rossiyskoi Akademii Estestvennikh Nauk.* – 2012;1:81-83.
2. Bazikov I. A., Akseenenko V. A., Hatkov E. M., Ghukasyan A. L., Seiranidu Z. A., Akseenenko V. A., Hatkov E. M., Ghukasyan A. L. *Medicinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza.* – 2012;7:81-82.
3. Bazikov I. A., Klimanovich I. V., Penkova N. I., Magonov M. M., Avakov T. A., Lysogora L. V., Hatkov E. M., Seiranidu Z. A., Ghukasyan A. L., Deryazhentseva M. A., Kalinkina N. I., Bazikov F. I. *Medicinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza.* – 2013;8:14-18.
4. Bazikov I. A. Patent RF № 2539396, 08. 29. 2014.
5. Bazikov I. A. Patent. RF № 2539397, 10. 22. 2014.

6. Базиков, И. А. Разработка фармацевтического противоопухолевого геля с ниосомальным доксорубином / И. А. Базиков, Е. В. Чекрыгина, И. В. Климанович, А. Н. Мальцев // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 163–166.
7. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
8. Владимиров, Ю. А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю. А. Владимиров, Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1980. – 319 с.
9. Добрецов, Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. – 287 с.
10. Bigantsoli, L. Compare combination doxorubicin / paclitaxel combination with doxorubicin/cyclophosphamide as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: a multicenter phase III trials of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 10961) / L. Bigantsoli, T. Kufer, P. Braning [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2002. – Vol. 20. – P. 3114–3121.
11. Dodge, J. T. The Preparation and Chemical Characteristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Erythrocytes / J. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1962. – Vol. 201. – P. 119–130.

6. Bazikov I. A., Chekrygin E. V., Klimanovich I. V., Maltsev A. N. *Medicinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza.* – *Medical News of North Caucasus.* 2015;10:163-166.
7. Vladimirov Yu. A., Proskurnina E. V. *Uspekhi biologicheskoy khimii.* – 2009;49:341-388.
8. Vladimirov Yu. A., Dobretsov G. E. *Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membrany.* M.: «Nauka»; 1980; 319 p.
9. Dobretsov G. E. *Fluorescentnye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov.* M.: «Nauka»; 1989; 287 p.
10. Bigantsoli L., Kufer T., Braning P., Coleman R., Strangled L., Calvert A. H., Gamuchchi T., Tvelvs K., Fargeau P., Epelbaum R., Lorish K., Picard G.M. *Journal of Clinical Oncology.* 2002;20:3114-3121.
11. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan. D. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 1962; 201:119-130.

Сведения об авторах:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии;
тел.: (8652)352475, 89188664027; e-mail: bazikov@list.ru

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией нанотехнологий лекарственных средств;
тел.: (8652)352475, 89054172205; e-mail: maltsev7@rambler.ru

Дискаева Елена Игоревна, кандидат физико-математических наук, заведующая кафедрой физики, математики и биотехнологии;
тел.: (8652)352721

Лукинова Вера Валерьевна, ассистент кафедры микробиологии;
тел.: (8652)352475

Айтекова Сафият Рашидовна, младший научный сотрудник лаборатории нанотехнологии лекарственных средств;
тел.: (8652)352475

© О. Ю. Лежнина, А. А. Коробкеев, 2016

УДК 611.12:616.132.2-008.63

DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2016.11012>

ISSN – 2073-8137

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ КОРОНАРНОГО РУСЛА СЕРДЦА БЕЗ НАРУШЕНИЯ КОРОНАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

О. Ю. Лежнина, А. А. Коробкеев

Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE MODERN PARAMETERS OF HEART CORONARY BED WITHOUT VIOLATION OF CORONARY CIRCULATION AND MYOCARDIAL INFARCTION

Lezhnina O. Yu., Korobkeev A. A.

Stavropol State Medical University, Russia

Исследованы субэпикардальные разветвления правой венечной артерии 35 сердец и 40 прижизненных коронароангиограмм людей пожилого возраста с левовенечным вариантом ветвления венечных артерий без нарушения коронарного кровообращения и с инфарктом миокарда.

Представлена сравнительная характеристика современных морфофункциональных параметров субэпикардального артериального русла сердца у людей пожилого возраста с левовенечным вариантом ветвлений венечных артерий без нарушения кровообращения в системе коронарных артерий и при инфаркте миокарда.

Ключевые слова: правая венечная артерия, морфофункциональные параметры, инфаркт миокарда, левовенечный вариант ветвлений венечных артерий, пожилой возраст

Subepicardial branchings of right coronary artery were studied in 35 hearts as well as 40 lifetime coronarographies in the elderly with the left variant of coronary branchings in norm and in myocardial infarction.

Comparative characteristics of modern morphological and functional parameters of subepicardial arterial bed of the heart in elderly people with the left variant of coronary branchings without circulatory disorders in the coronary arteries and in myocardial infarction are represented.

Key words: right coronary artery, morphological and functional parameters, myocardial infarction, left variant of coronary branchings, elderly age

В настоящее время причиной общей высокой смертности в Российской Федерации продолжают оставаться сердечно-сосудистые заболевания, в частности ишемическая болезнь сердца. Однако на протяжении последних лет в странах Западной Европы, США отмечается общая тенденция к снижению смертности от ишемической болезни сердца, тогда как в России, наоборот, наблюдается её рост [4, 5, 13]. Распространенность ишемической болезни сердца в

нашей стране составляет 13,5 %, в США – почти в 2 раза ниже – 7 % [12, 14].

Существуют данные, характеризующие коронарные разветвления сердца [6, 7, 8, 10], организацию субэпикардального венозного русла [2, 3], топографо-анатомические взаимоотношения венечных артерий и вен сердца [11]. Однако практически отсутствуют сведения об особенностях организации субэпикардального артериального русла без нарушения коронарного кровообращения и при инфаркте