

Исследование параметров ПОЛ в липосомальных суспензиях с добавлением хлорофилла при хранении

Н. В. ПШЕЧЕНКО¹, Т. А. МАРИШИНА¹, А. В. МАРТЫНОВ²

¹Харьковский Национальный Университет им. В.Н. Каразина,

²Харьковский НИИ микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова

Investigation of LPO Parameters in Liposomal Suspensions with Chlorophyll Adding During Storage

PSHECHENKO N.V.¹, MARISHINA T.A.¹, MARTYNOV A.V.²

¹Kharkov National University named by V.N. Karazin, Kharkov

²Kharkov R&D Institute of Microbiology and Immunology named by I.I. Mechnikov, Kharkov

Липосомы являются перспективным носителем лекарственных веществ в организме человека [2, 4]. Включенные в липосомы препараты имеют пролонгированное действие, обладают полной деградируемостью, способны избирательно накапливаться в клетках-мишенях [1, 5]. При этом остается нерешенной проблема хранения и стерилизации лекарственных липосомальных форм из-за происходящих деструктивных изменений липосомальной мембраны, главным образом связанных с процессами ПОЛ. Для предотвращения разрушения липосом процессами ПОЛ применяют различные стабилизаторы, в том числе и эктерицид [3]. Нами было предложено использовать смесь эктерицида + природный α -хлорофилл из эвкалипта для регуляции процессов ПОЛ и увеличения сроков хранения липосом.

Цель работы – проследить изменение содержания продуктов ПОЛ в суспензиях липосом различных сроков хранения при 3-4°C.

В работе использовали лиофилизированные фосфатидилхолиновые липосомы, полученные методом обращенных фаз [6]. Из сухих липосом *ex tempore* готовили суспензии на эктерициде (липосомы + эктерицид, липосомы + эктерицид + хлорофилл). Для приготовления экспериментальных образцов использовали 500 мг лиофилизированных липосом, суспендированных в 10 мл эктерицида. В отдельных сериях к суспензии липосом в эктерициде добавляли 3 мл 1%-го раствора хлорофилла (спиртовой). Измерения проводили в свежеприготовленных суспензиях, а также в суспензиях месячного и годового сроков хранения при температуре 3-4°C. Спектрофотометрически измеряли содержание первичных продуктов ПОЛ: диеновых (ДК), оксодиеновых (ОДК), триеновых (ТК), тетраеновых (ТЕТ) конъюгатов. Количество вторичных продуктов ПОЛ – диальдегидов и МДА, а также общую антиокислительную активность (АОА) системы – способность тканей влиять на скорость окисления стандартного липидного субстрата определяли колориметрическим методом. В качестве субстрата использовали различные ненасыщенные соединения: эфиры ненасыщенных жирных кислот, метилолеат, арахиден и др. Субстрат окисления выбирали по способности вещества окисляться с постоянной скоростью при сравнительно невысоких температурах (около 50°C) и свободном доступе кислорода. В наших экспериментах в качестве субстрата окисления использовали 2%-й раствор олеата в спирте, интенсивность процесса окисления оценивали по накоплению продуктов окисления. Абсолютное

Liposomes are perspective carriers of medicinal substances into human organism [2, 4]. Liposome-incorporated preparations have a prolonged effect, possess the total degradation ability, are capable to be selectively accumulated in cells-targets [1, 5]. At the same time the problem of storage and sterilisation of medicinal liposomal forms has remained still unsolved due to the occurring destructive changes in liposomal membrane, mainly related to the LPO processes. There are applied various stabilizers, including ecteridum for preventing liposomes destruction by LPO processes [3]. We have proposed to use the mixture of ecteridum + natural α -chlorophyll from the eucalyptus for the LPO processes regulation and increase in liposome storage terms.

The aim of the work was to trace the change in the LPO products content in liposome suspensions of different storage terms at 3-4°C.

Lyophilized phosphatidyl choline liposomes, obtained by means of the inverted phase method, were used in the work [6]. Suspensions on the ecteridum (liposomes + ecteridum, liposomes + ecteridum + chlorophyll) were prepared from dry liposomes *ex tempore*. For preparing the experimental samples we used 500 mg of lyophilized liposomes, suspended in 10 ml of ecteridum. In some series we added 3 ml of the 1% chlorophyll solution (alcoholic) to liposome suspension in ecteridum. The measurements were carried-out in freshly prepared suspensions, as well as in the suspensions of a month and year storage term at 3-4°C temperature. There was measured the content of such primary LPO products as: diene conjugates (DC), oxodiene conjugates (ODC), triene conjugates (TC), tetraene conjugates (TET). The number of secondary LPO products: dialdehydes and MDA, as well as the total antioxidant activity (AOA) of the system, that is the tissue capability to affect the oxidation rate of standard lipid substrate, were determined using the colorimetric method. Different non-saturated compounds such as the ethers of non-saturated fatty acids, methyl oleate, arachideneum etc., were used as a substrate. The oxidation substrate was selected by the capability of substance to be oxidized with the constant rate under comparatively low temperatures (about 50°C) and a free oxygen access. In our experiments as the oxidation substrate we used the 2% oleate solution in the alcohol, the intensity of oxidation process was evaluated by the oxidation product accumulation. The absolute value of the content of studied substances was determined after

значение содержания исследуемых веществ определяли после пересчетов с использованием коэффициента молярной экстинкции для каждого вещества. Результаты исследований обрабатывали методами математической статистики с помощью критерия Стьюдента.

Как видно из рис. 1, хранение липосом в эктерициде приводит со временем к накоплению всех продуктов ПОЛ, дестабилизирующих структуру липосом. Так, после хранения суспензии в течение 12 мес содержание в ней ДК увеличилось в 36, ОДК – в 70, ТК – в 77, ТЕТ – в 80, МДА – в 50 раз по сравнению со свежеприготовленной суспензией. Однако, наряду с этим, в 22 раза увеличивается общая АОА системы в целом, что свидетельствует об интенсификации антиоксидантных процессов.

Как видно из рис. 2, увеличение содержания продуктов ПОЛ и АОА в суспензии липосомы + эктерицид с добавлением хлорофилла протекает менее интенсивно, чем в суспензии липосомы + эктерицид. Так, количество ДК возросло в 20,5; ТК – в 10,6; ОДК – в 12,7; ТЕТ – в 10,8; МДА – в 5, АОА системы – в 35 раз.

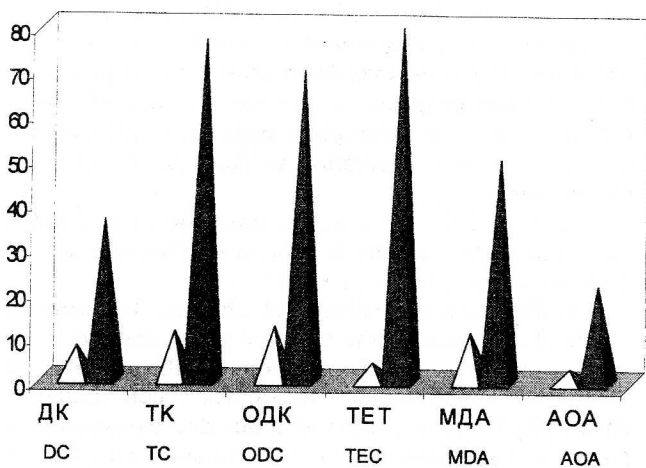


Рис. 1. Изменение содержания продуктов ПОЛ в липосомальной суспензии (липосомы+эктерицид) разных сроков хранения по сравнению со свежеприготовленной: □ - 1 месяц, ■ - 1 год.

Fig. 1. Change in the LPO products content in liposomal suspension (liposomes + ectericidum) of different storage terms in comparison with the freshly prepared one:

□ - 1 month, ■ - 1 year.

Таким образом, наблюдая за изменением параметров ПОЛ в суспензиях липосом: липосомы + эктерицид и липосомы + эктерицид + хлорофилл, мы видим, что добавление хлорофилла в суспензию липосом снижает интенсивность процессов перекисного окисления. По-видимому, это связано со свойствами хлорофилла, известного как фотоактивное соединение, которое в зависимости от условий может выступать акцептором электронов и обеспечивать блокаду ПОЛ в липосомах. В связи с этим можно говорить об эффективности использования хлорофилла в качестве ингибитора процессов ПОЛ в липосомах, т. е. стабилизатора липосомальной мембраны, позволяющего увеличивать сроки хранения липосомальной суспензии.

calculations using the molar extinction coefficient for every substance. The investigation results were processed using the methods of mathematical statistics by means of the Student's criterion.

The Figure 1 shows that the liposome storage in ectericidum results with time in the accumulation of all LPO products, destabilizing the liposome structure. Thus, after storing suspension within 12 months the content in it of DC increased in 36 times, ODC in 70 times, TC in 77 times, TEC in 80 times, MDA in 50 times in comparison with freshly prepared suspension. However, along with this, there was an increase in 22 times in the total AOA system in the whole, that testifies to the intensification of antioxidant processes.

The Figure 2 demonstrates, that an increase in the content of LPO products proceeds less intensively, than in the liposome+ectericidum suspension. Thus, the DC number augmented in 20,5; TC in 10,6; ODC in 12,7, TEC in 10,8; MDA in 5, the system AOA in 35 times.

So, when observing the change in the LPO parameters in such liposome suspensions as liposomes + ectericidum and liposomes + ectericidum + chlorophyll,

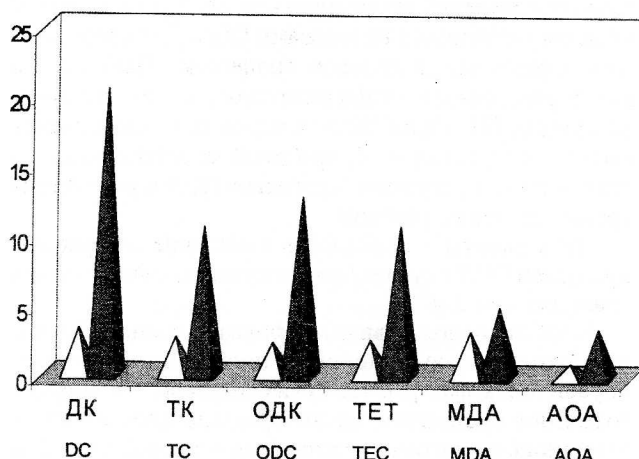


Рис. 2. Изменение содержания продуктов ПОЛ в липосомальной суспензии (липосомы + эктерицид + хлорофилл) разных сроков хранения по сравнению со свежеприготовленной:

□ - 1 месяц, ■ - 1 год.

Fig. 2. Change in the LPO products content in liposomal suspension (liposomes + ectericidum + chlorophyll) of different storage terms in comparison with the freshly prepared one:

□ - 1 month, ■ - 1 year.

we can see, that the chlorophyll adding into the liposome suspension decreases the intensity of peroxidation processes. Apparently, this is related to chlorophyll properties, known as a photoactive compound, which depending on the conditions, can act as the electron acceptor and provide the LPO blockade in the liposomes. In this connection we can speak about the efficiency of chlorophyll usage as the inhibitor of LPO processes in liposomes, i.e. the stabilizer of liposomal membrane, permitting to increase the storage terms for liposomal suspension.

References

1. *Introduction in membranology* / Edited by A.A. Boldyrev. – M.: Moscow State University, 1990. – 230p.

Литература

1. *Введение в биомембранологию* / Под ред. А. А. Болдырева. – М.: МГУ, 1990. – 230 с.
2. *Грегориadis Г., Аллисон Л.* Липосомы в биологических системах. – М.: Медицина, 1983. – 384 с.
3. *Дикий И. Л., Стрельников Л. С., Перцев И. М.* Обоснование некоторых конструктивных, технологических и фармакокинетических характеристик липосом и липосомальных лекарственных форм // *Вестн. фармации.* – 1993. – № 1-2. – С. 75-79.
4. *Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д.* Липосомы и их взаимодействие с клетками. – М.: Наука, 1986. – 240 с.
5. *Торчилин В.П., Смирнов В.Н., Чазов Е.И.* Проблемы и перспективы использования липосом для направленного транспорта лекарств (обзор) // *Вопросы мед. химии.* – 1982. – Т. XXVIII. – С. 3-13.
6. *Kim R. S., Labella F.* Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation of authentic lipids // *J. Lipid. Res.* – 1987. – V. 28. – P. 1110-1117.
2. *Gregoriadis G., Allison L.* Liposomes in biological systems. – M.: Meditsina, 1983. – 384 p.
3. *Dikij I.L., Strel'nikova L.S., Pertsev I.M.* Substantiation of certain constructive, technological and pharmacokinetic characteristics of liposomes and liposomal medicinal forms // *Vestnik farmatsii.* – 1993. – N1.2. – P. 75-79.
4. *Margolis L.B., Bergelson L.D.* Liposomes and their interaction with cells. – M.: Nauka, 1986. – 240 p.
5. *Torchilin V.P., Smirnov V.N., Chazov E.I.* Problems and perspectives of liposome usage for directed medicines transport (review) // *Voprosy med. khimii.* – 1982. – V. XXVIII. – P. 3-13.
6. *Kim R. S., Labella F.* Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation of authentic lipids // *J. Lipid. Res.* – 1987. – V. 28. – P. 1110-1117.

Accepted in 18.09.2002

Поступило 18.09.2002