

8. Tolochko, V. M. Izuchenie opyta legalizacii deyatelnosti-internet aptek v stranah Evrosoyuza i vozmozhnost' ego ispol'zovaniya v Ukraine [Text] / V. M. Tolochko, Yu. P. Medvedeva, T. F. Muzyka // Nauchnye vedomosti. Seriya medicina. Farmaciya. – 2013. – Vol. 22, Issue 11 (154). – P. 239–244.

9. Nemchenko, A. S. Naukove uzahal'nennya svitovoho dosvidu vprovadzheniya novitnikh tekhnolohiy z elektronnoyi retseptury [Text] / A. S. Nemchenko, L. V. Tereshchenko, N. V. Teterych // Klinichna farmatsiya. – 2012. – Vol. 16, Issue 4. – P. 25–30.

10. Pernice, K. 2017 Intranet Design Annual [Text] / K. Pernice. – Nielsen Norman Group, 2017. – 483 p.

Дата надходження рукопису 28.04.2017

Iryna Timanyuk, PhD, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Marketing and Management, National University of Pharmacy, Pushkinska str., 53, Kharkiv, Ukraine, 61002
E-mail: timanjuk@gmail.com

Iryna Pestun, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Marketing and Management, National University of Pharmacy, Pushkinska str., 53, Kharkiv, Ukraine, 61002
E-mail: irynapestun@ukr.net

УДК615.014.23; 615.22; 615.324.

DOI: 10.15587/2519-4852.2017.104954

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЦИТОХРОМА C

© Д. М. Пилипенко, А. Г. Кацай, В. В. Прохоров, Н. Ф. Конахович, А. С. Григорьева, Ю. М. Краснопольский

Цель: целью работы явилось исследование антиаритмического действия свободной и липосомальной форм цитохрома C.

Методы: липосомы получали методом липидной пленки с последующей гомогенизацией при высоком давлении. Определяли размер частиц и степень включения. Проведено изучение аритмии с использованием хлоридбариевой модели. Регистрировали время возникновения и продолжительность аритмии у каждого животного электрокардиографическим методом. Бария хлорид, в соответствии с общепринятой методикой, вводили в дозе 4 мг/кг. В качестве стандартного образца использовали амиодарон в дозе 5 мг/кг. Обе формы цитохрома C вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг.

Результаты исследования: авторами предложена технология получения липосомальной формы цитохрома C, изучено включение субстанции в состав липосомы (не менее 95 %) и размеры полученных наночастиц (100–170 нм). Показано достоверное снижение времени аритмии при использовании цитохрома C. Липосомальная форма цитохрома C (10 мг/кг) проявляет более высокую активность по сравнению со свободной формой препарата и снижает время аритмии по сравнению с контролем более чем в 2 раза.

Выводы: липосомальная форма цитохрома C является перспективным антиаритмиком т.к. по сравнению с амиодароном, обладающим широким спектром побочных действий, отличается крайне низкой токсичностью. В дальнейших исследованиях планируется изучить дозозависимый эффект липосомальной формы цитохрома C и мембрано-стабилизирующие свойства в модельных экспериментах при ишемической болезни сердца и аритмиях

Ключевые слова: аритмия, цитохром C, липосомы, технология получения липосом, липосомальная форма цитохрома C

1. Введение

Одним из препаратов, используемых в лечении сердечно-сосудистых заболеваний является цитохром C (ЦС) – периферический водорастворимый мембранный белок с М.м. 12,5 кДа. ЦС является одним из ключевых белков дыхательной цепи митохондрий, переносящий электроны от III к IV комплексу дыхательной цепи [1]. Антиоксидантная активность ЦС обусловлена его способностью окислять супероксидный радикал с образованием молекулярного кислорода. При выходе из митохондрий в цитоплазму ЦС запускает каскад реакций, заканчивающихся апоптозом – запрограммированной смертью клетки. Этому предшествует образование комплекса ЦС с кардиолипином, анион-

ным фосфолипидом внутренней мембраны митохондрий, в результате чего происходит изменение конформации ЦС и появление у него высокой пероксидазной активности [1, 2].

2. Постановка проблемы в общем виде, актуальность темы и ее связь с важными научными или практическими вопросами

Недостаток содержания ЦС сопровождается резким нарушением процесса поглощения кислорода и окислительных процессов в клетке, приводящих к гипоксии и аритмии [3]. ЦС применяют при комбинированной терапии критических состояний: показана эффективность при отравлении снотворными средствами, окисью углерода, токсических, инфек-

ционных и ишемических повреждениях миокарда, пневмониях, нарушениях мозгового и периферического кровообращения, при асфиксии новорожденных и инфекционном гепатите.

3. Анализ последних исследований и публикаций, в которых начато решение данной проблемы и на которые опирается автор

Клинические исследования показали, что применение препарата ЦС оказалось эффективным при комплексном лечении пациентов с ишемической болезнью сердца, осложненной нарушениями ритма и/или хронической сердечной недостаточностью I–II функциональных классов, что проявлялось в улучшении клинической симптоматики, показателей качества жизни, повышении толерантности к физической нагрузке [4, 5]. После десятидневного курса терапии препаратом ЦС у пациентов отмечалось уменьшение значимых как предсердных, так и желудочковых экстрасистол, причем снижение последних отмечалось у 75 % пациентов [6]. Отмечена тенденция к уменьшению градации желудочковых экстрасистол и частоты встречаемости ишемических изменений по данным 24-часового мониторинга электрокардиограммы (ЭКГ) [5, 6]. В клинике используют препараты ЦС, для лечения патологических состояний, связанных с гипоксией, нарушений окислительно-восстановительных процессов в тканях, таких как: асфиксия новорожденных, сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, старческая дегенерация сетчатки, отравление снотворными препаратами и окисью углерода, кровопотери и т.п. [7].

4. Выделение не решенных ранее частей общей проблемы, которой посвящена статья

Учитывая, что существенным недостатком ЦС является его крайне низкое проникновение через биомембраны в клетку и быстрое выведение из организма перспективным является создание препаратов ЦС в липосомах (ЛС), что может повысить его биодоступность [8, 9].

Препараты метаболической группы особенно эффективны в лечении брадикардийных и остро возникших желудочковых аритмий в комплексе с классическими антиаритмиками, что позволяет повышать эффективность и безопасность их использования [10]. По нашему мнению, ЛС форма ЦС может позволить повысить эффективность ЦС в кардиологии, в том числе и усилить его антиаритмическое действие.

5. Формулирование целей (задачи) статьи

Целью исследования явилось изучение антиаритмического действия предложенной нами ЛС-формы ЦС и «свободной» формы ЦС.

6. Изложение основного материала исследования (методов и объектов) с обоснованием полученных результатов

Материалы. В качестве стандартного антиаритмика использовали препарат «Амиодарон» 50 мг/мл, производства ПАТ НВЦ Борщаговский ХФЗ, Украина. Для получения липосом использовали фосфатидилхолин (ФХ) Lipoid E 100 (LipoidGermany), дипальмито-

илфосфатидилглицерин (ДПФГ) (LipoidGermany), цитохром С (H hebei lead bio-chemicals co., ltd, China).

Модель аритмии. Исследования проводились на калифорнийских кроликах массой 2,5–3,5 кг на модели хлоридбариевой аритмии. Бария хлорид в диастолической фазе сердечного ритма снижает проницаемость клеточных мембран для калия и повышает его для натрия. После введения бария хлорида развивается многофокальная аритмия с желудочковой экстрасистолией. Доза исследуемого вещества должна обеспечивать уменьшение или полное устранение аритмии в течение определенного времени, при этом снижение аритмии наблюдается не менее чем у 50 % животных. Модель считается адекватной для выявления веществ со свойствами антиаритмиков III класса [11, 12]. Время возникновения и продолжительность аритмии у каждого животного регистрируют с помощью электрокардиографа путем наложения электродов на конечности. После записи фоновой ЭКГ в/в медленно (в течении 20 секунд) вводят аритмогенный агент – бария хлорид дозе 4 мг/кг в виде 1 % раствора, после чего через 2 минуты на фоне развития выраженной аритмии в/в вводят исследуемые препараты (ЛС-форма ЦС и «свободный» ЦС в дозе 10 мг/кг) и препарат сравнения (амиодарон в дозе 5 мг/кг). Контрольным животным вводят бария хлорид. Эффективность антиаритмического действия оценивают по длительности аритмии и проценту животных, у которых восстанавливался синусовый ритм, т.е. по возвращению ЭКГ к исходной [13, 14].

Получение липосом с цитохромом С. ЛС-форма ЦС получена при использовании ФХ и анионного фосфолипида ДПФГ. ЛС получали методом липидной пленки с последующим суспендированием её раствором ЦС. При получении ЛС использована способность образования комплекса между ЦС и отрицательно заряженным фосфолипидом – ДПФГ [15]. Причем, степень включения ЦС зависит от соотношения используемых липидных компонентов и количества взятого ЦС. В этих условиях положительно заряженные аминогруппы на молекулах ЦС вступают во взаимодействие с отрицательно заряженными группами на молекуле ДПФГ.

Полученную эмульсию подвергали гомогенизации при высоком давлении, проводили стерилизующую фильтрацию через мембраны с размером пор 0,22 мкм и полученную эмульсию ЛС лиофилизировали (криопротектор – лактоза). Средний размер наночастиц – 100–170 нм. Размер липосом измеряли на наносайзере Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания), методом динамического светорассеивания. Включение ЦС в ЛС не менее 95 %. Степень инкапсуляции определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Nexera Shimadzu (Япония), хроматографическая колонка Tricorn (GE Healthcare, Швейцария), заполненная сорбентом superose 12. Условия хроматографирования: подвижная фаза: 4,515 г/л KH_2PO_4 , pH – 6,0 (при помощи 2М NaOH); скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин; детектирование при длине волны 409 нм; температура колонки 25 °С. В качестве стандарта активной субстанции использовали цитохром С USP RS [16].

Статистическая обработка. При оценке достоверности различия полученных данных использовали непарный критерий Стьюдента.

Полученные результаты и их обсуждение.

Нарушения ритма сердечной деятельности возникали через 20–25 с после введения бария хлорида, и, по данным ЭКГ, если не появлялось трепетание и фибрилляция желудочков, аритмия продолжалась в течение 46 ± 2 мин, после чего отмечалось восстановление синусового ритма. В опытах на интактных кроликах после записи фоновой ЭКГ во II стандартном отведении животным вводили раствор бария хлорида (4 мг/кг). Барий хлористый приводит к политонной желудочковой аритмии. Через 2 мин после введения аритмогена на фоне развившейся аритмии в/в вводили препарат сравнения и исследуемые препараты. Эффективность антиаритмического действия веществ оценивали по длительности аритмии и проценту животных, у которых ритм полностью восстанавливался.

Результаты антиаритмического действия образцов приведены на рис. 1.

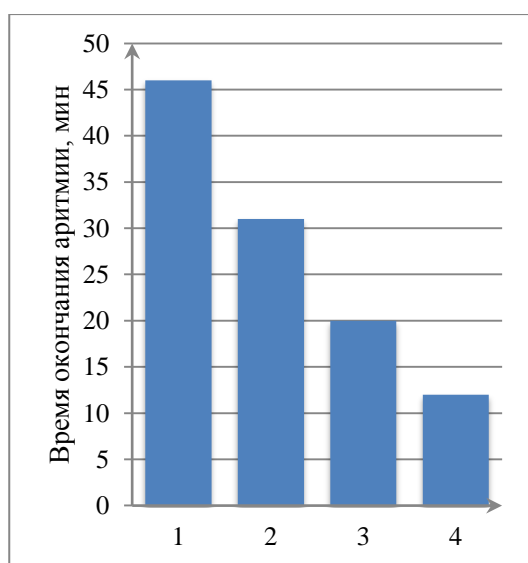


Рис. 1. Результаты антиаритмического действия препаратов ЦС и Амиодарона: 1 – Контроль (бария хлорид); 2 – ЦС свободный; 3 – ЛС-форма ЦС; 4 – Амиодарон. ($P < 0,001$)

Исследуемые препараты способствовали восстановлению синусового ритма, причем время восстановления ритма у животных, которым вводили ЛС форму ЦС, существенно ниже, по сравнению с животными, которым вводили ЦС в «свободной» форме. Время нормализации цикла при применении амиодарона несколько ниже, чем при использовании ЛС формы ЦС. Амиодарон – антиаритмическое средство, наиболее часто используемое при лечении желудочковых и наджелудочковых аритмий, которые сопровождаются тяжелой клинической симптоматикой и/или угрожают жизни больного и рефрактерны к терапии обычными антиаритмическими препаратами.

Не обнаружены в литературе данные изучения ЛС-формы ЦС при хлоридбариевой аритмии. В то же время на модели острой окклюзии коронарной артерии крыс (получена при перевязке нисходящей ветви артерии) проведено изучение влияния ЛС формы ЦС. Изучалась частота развития ранних постокклюзионных аритмий (частые политонные эстрасистолы, фибрилляция желудочков). Введение ЛС-формы ЦС внутрибрюшинно в дозе 0,4 мг/кг достоверно снижа-

ет число аритмий по сравнению с контролем в 2 раза [17]. Можно предположить, что ЛС форма ЦС независимо от модели способна снижать аритмогенное действие.

Нарушения сердечного ритма – одно из наиболее частых и тяжелых осложнений различных сердечно-сосудистых заболеваний – ишемической болезни сердца, миокардита, ревматических пороков, кардиомиопатии, гипертонической болезни и др. Аритмия и фибрилляция желудочков наблюдаются в 94 % случаев у больных с инфарктом миокарда, и, как правило, являются непосредственной причиной смерти. Многообразие форм аритмий, их большая распространенность, опасность для жизни – основные причины, которые требуют создания эффективных и безопасных лекарственных средств для профилактики и лечения нарушений сердечного ритма. Антиаритмические препараты отличаются рядом нежелательных побочных эффектов. Отрицательное инотропное и дромотропное действие, характерное для антиаритмических препаратов, может быть причиной развития явлений сердечной недостаточности, а в 10 % случаев и аритмогенного действия. ЛС форма ЦС, по нашему мнению, перспективна для разработки противоаритмического препарата т.к. лишена нежелательных побочных эффектов. ЦС является субстанцией с очень низкой токсичностью. Так, по данным литературы, LD_{50} ЦС на мышах при в/в составляет более 3000 мг/кг. Преимуществом ЦС является гораздо меньший спектр побочных реакций, среди которых наиболее частыми являются аллергия, озноб, гипертермия [18]. Однако снизить риск их возникновения, а также повысить эффективность ЦС, возможно с помощью его заключения в ЛС. ЛС по природе сходны с липидным составом клеточных мембран, нетоксичны, легко биодegradируемы, их оболочка может сливаться с клеточной мембраной, обеспечивая доставку содержимого ЛС в клетку. Вещество, заключенное в ЛС, защищено от воздействия неблагоприятных факторов, что позволяет повысить его биодоступность. С другой стороны, ЛС не позволяет препарату превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма, снижая его. Повышение антиаритмического действия, возможно, зависит от увеличения вводимой дозы. Кроме того, известно, что только нарушение целостности клеточных мембран дает возможность экзогенному ЦС проникать в клетку. По нашему мнению, использование ЛС формы ЦС позволяет ему более эффективно проникать в клетку и встраиваться в поврежденные участки митохондрий сердечной мышцы, реконструируя поврежденную дыхательную цепь с усилением процессов окислительного фосфорилирования.

ЦС является одним из метаболических средств обладающих непосредственным мембраностабилизирующим, противоаритмическим и противоишемическим действием [1, 2] и повышение биодоступности ЦС можно обеспечить его ЛС формой.

7. Выводы из проведенного исследования и перспективы дальнейшего развития данного направления

В заключение хотелось бы отметить, что «свободная» форма ЦС и ЛС форма ЦС – проявляют выраженный противоаритмический эффект, способ-

ствуя нормализации сердечного ритма, восстанавливая функции основных показателей работы сердечно-сосудистой системы сердца у экспериментальных животных (кроликов) на фоне хлоридбарбитуровой аритмии. Отмечается выраженная статистически достоверная тенденция к снижению времени необходимого для восстановления сердечного ритма: на 31 % при использовании свободной формы и

на 57 % при липосомальной. В перспективных исследованиях нами планируется изучить дозозависимый эффект ЛС-формы ЦС и мембрано-стабилизирующие свойства в модельных экспериментах при ишемической болезни сердца. ЛС форма ЦС является перспективным антиаритмиком т.к. по сравнению с амиодароном обладает незначительными побочными действиями.

Литература

1. Ващенко, В. И. Цитохром С как лекарственное средство: прошлое, настоящее, будущее [Текст] / В. И. Ващенко, К. П. Хансон, П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 27–37.
2. Владимиров, Ю. А. Молекулярные механизмы апоптоза. Структура комплекса цитохрома С с кардиолипином [Текст] / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, А. В. Алексеев // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 10. – С. 1391–1404.
3. Бояринов, Г. А. Применение цитохрома С для профилактики реперфузионных повреждений миокарда при протезировании клапанов сердца в условиях искусственного кровообращения [Текст] / Г. А. Бояринов, А. Ю. Яковлев, С. А. Тезяева и др. // Вестник хирургии. – 2001. – № 1. – С. 15–20.
4. Баллюзек, М. Ф. Рациональный выбор терапии препаратами метаболических групп при ишемической болезни сердца [Текст] / М. Ф. Баллюзек, И. Г. Семенова // Практическая медицина. – 2013. – № 3. – С. 47–51.
5. Семенова, И. Г. Эффективность терапии больных хронической сердечной недостаточностью и нарушениями ритма сердца препаратом цитохром С [Текст] / И. Г. Семенова, М. Ф. Баллюзек, Ю. А. Новиков, Ф. А. Тугушева // Фарматека. – 2013. – № 10. – С. 86–91.
6. Семенова, И. Г. Метаболическая терапия в пожилом и старческом возрасте при нарушениях ритма сердца и хронической сердечной недостаточности [Текст] / И. Г. Семенова // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2012. – № 1. – С. 458–459.
7. Оковитый, С. В. Клиническая фармакология: избранные лекции [Текст] / С. В. Оковитый, В. В. Гайворонская, А. Н. Куликов, С. Н. Шуленин. – М.: ГЭОТАР-Медина, 2009. – 608 с.
8. Шанская, А. И. Липосомальные наносистемы на основе соевых фосфолипидов как контейнер для лекарственных средств [Текст] / А. И. Шанская, С. М. Пучкова // Трансфузиология. – 2013. – Т. 14, № 2. – С. 66–75.
9. Хромов, А. С. Липосомальные препараты – реализация нанотехнологий в медицине [Текст] / А. С. Хромов // Фармакология та лікарська токсикологія. – 2016. – № 2. – С. 14–23.
10. Балькова, Л. А. Препараты метаболического типа действия в лечении аритмий сердца [Текст] / Л. А. Балашова, В. П. Балашов, И. А. Маркелова, М. И. Альмяшева. – Саранск: Референт, 2007. – 134 с.
11. Доклинические исследования лекарственных средств [Текст]: метод. реком. [Текст] / ред. А. В. Стефанов. – К.: Авиценна, 2002. – 568 с.
12. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая [Текст] / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунатян и др. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
13. Скоробогатова, Т. А. Исследования антиаритмической активности анилокаина и лидокаина при хлорбарбитуровой аритмии [Текст] / Т. А. Скоробогатова, В. И. Пануркин, М. Н. Ивашев // Кубанский научно-медицинский вестник. – 2011. – № 5. – С. 155–160.
14. Борисова, Е. Я. Антиаритмики нового поколения класса функционально замещенных аминов [Текст] / Е. Я. Борисова, Д. М. Зверев, Г. А. Фомичева и др. // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11, № 3-4. – С. 79–83.
15. Пат. № 022183 Евразийское патентное ведомство. Способ получения липосомальной формы цитохрома С [Текст] / Шоболов Д. Л., Краснополяский Ю. М., Ульянов А. М. и др.; патентовладелец ООО «ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВ». – № 201201592; заявл. 30.11.2012; опублик. 24.12.2015. – 9 с.
16. Кацай, О. Г. Розроблення та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах [Текст] / О. Г. Кацай, В. В. Прохоров, Г. С. Григор'єва, Ю. М. Краснополяський // Фармацевтичний журнал. – 2016. – № 5. – С. 69–75.
17. Пат. № 2110990 RU. Липосомальная везикула с Цитохромом С. МПК А61К9/127 [Текст] / Шанская А. И., Криво ручко Б. И., Бушнева Е. В. и др. – № 94027343/14; заявл. 14.07.1994; опублик. 20.05.1998.
18. КОМПЕНДИУМ 2016 – лекарственные препараты [Текст]: справочник / ред. В. Н. Коваленко. – К.: Морион, 2016. – 2416 с.

Дата надходження рукопису 14.04.2017

Пилипенко Дарья Михайловна, кафедра биотехнологии, биофизики и аналитической химии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Кирпичёва, 2, г. Харьков, Украина, 61002, E-mail: daria1003@ukr.net

Кацай Алексей Григорьевич, аспирант, ООО «Наномедтех», ул. Антоновича, 68, г. Киев, Украина, 03680

Прохоров Виталий Валентинович, главный технолог, ООО «Наномедтех», ул. Антоновича, 68, г. Киев, Украина, 03680

Конахович Наталья Филимоновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, ул. Эжена Потье, 14, г. Киев, Украина, 03057

Григорьева Анна Саввична, доктор химических наук, заместитель директора по научной работе, Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, ул. Эжена Потье, 14, г. Киев, Украина, 03057

Краснополяский Юрий Михайлович, доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра биотехнологии, биофизики и аналитической химии, Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Кирпичёва, 2, г. Харьков, Украина, 61002