

МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ТЕТРА-3-ФЕНИЛТИОФТАЛОЦИАНИНА ГИДРОКСИАЛЮМИНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ МУТАГЕННЫХ И ИММУНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, Н.В. Голубцова,
А.А. Рудакова, З.А. Соколова, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Л.Р. Тилова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Леонидовна Николаева alima91@yandex.ru

Введение. Применение липосом в качестве систем доставки лекарственных средств в организм человека сегодня является признанным подходом к повышению эффективности лечения. По сравнению с другими наноразмерными носителями липосомы отличаются высокой биосовместимостью. Однако в литературных источниках имеется ряд данных об иммуногенности некоторых липосомальных препаратов. Проявления реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степени отмечены у части пациентов при внутривенном введении липосом Doxil[®], Ambisome[®], DaunoXome[®]. Технология производства липосом — достаточно трудоемкий процесс, поэтому получение липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) в промышленных масштабах для проведения доклинических и клинических исследований проблематично для исследователей и производителей всего мира. В связи с этим актуальным представляется проведение исследований специфической токсичности липосомальных препаратов и масштабирования технологии получения липосом.

Цель исследования — оценка качества опытных образцов ЛЛФ на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия, полученных по масштабированной технологии, в сравнении с образцами, произведенными в лабораторных условиях, а также изучение их мутагенных и иммунотоксических свойств.

Объект исследования — тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия липосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1,5 мг, во флаконах вместимостью 20 мл.

Материалы и методы. В работе использовались метод Бенгема, экструзия, стерилизующая фильтрация, лиофилизация; тест на нарушение целостности межклеточных контактов (на промоторную активность), бактериальный тест Эймса, цитогенетическое исследование по учету хромосомных aberrаций, тест на способность вызывать повреждение ДНК (тест ДНК-комет), метод Эрне; реакция гиперчувствительности замедленного типа, определение массы и клеточности центральных и периферических органов иммунитета, оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

Результаты. По результатам проведенных исследований масштабирована технология получения ЛЛФ, позволяющая получать до 400 флаконов ЛЛФ за один производственный цикл. Установлено, что ЛЛФ в дозах 6 и 24 мг/кг не увеличивает количество хромосомных аномалий у мышей и не вызывает повреждений ДНК, в дозах 1, 1–22,0 мг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг в тесте на промоторную активность не разобщает межклеточные контакты. Определено, что ЛЛФ в дозах 6 и 12 мг/кг при 1-кратном внутривенном введении не оказывает влияния на гуморальный и клеточный иммунные ответы, не изменяет массу и клеточность центральных и периферических органов иммунной системы. ЛЛФ через 24 ч после введения в дозах 6 и 12 мг/кг дозозависимо снижает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, которая восстанавливается через 7 сут.

Заключение. Масштабирована технология получения ЛЛФ. В исследуемых дозах установлено отсутствие у ЛЛФ способности промотировать процесс канцерогенеза и влиять на гуморальный и клеточный иммунные ответы.

Ключевые слова: липосомальная лекарственная форма тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия, масштабирование производства, мутагенные свойства, иммунотоксичность

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-83-94

SCALING OF THE TECHNOLOGY OF OBTAINING THE HYDROXYALUMINIUM TETRA-3-PHENYLTHIO- PHTHALOCYANINE LIPOSOMAL FORM AND STUDYING ITS MUTAGENIC AND IMMUNOTOXIC PROPERTIES

A. V. Lantsova, L. L. Nikolaeva, N. A. Oborotova, E. V. Sanarova, O. L. Orlova, N. V. Golubtsova, A. A. Rudakova,
Z. A. Sokolova, K. I. Kirsanov, E. A. Lesovaya, L. R. Tilova

N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. The use of liposomes as drug delivery systems today is a recognized approach to improving the effectiveness of treatment. Compared with other nanosized carriers, liposomes are highly biocompatible. However, in the literature, there are a number of data on the immunogenicity of some liposomal drugs. Hypersensitivity reactions of moderate to severe severity were noted in some patients with intravenous administration of liposomes Doxil®, Ambisome®, DaunoXome®. The technology of production of liposomes is a laborious process and obtaining liposomal forms on an industrial scale is problematic for researchers and manufacturers around the world. In connection with this, studies on the scaling up of technology for obtaining liposomes and studying the specific toxicity of liposomal preparations are relevant.

Objective — evaluation of the quality of prototypes of liposomal dosage form based on tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyaluminum obtained by scaled technology in comparison with samples produced in laboratory conditions, as well as studying their mutagenic and immunotoxic properties.

Object of the study — tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyaluminum liposomal, lyophilizate for the preparation of injection for injection of 1,5 mg, in bottles with a capacity of 20 ml (LLF).

Materials and methods. Bengem's method, extrusion, sterilizing filtration, lyophilization, intercellular contact integrity test (for promoter activity), Ames bacterial test, cytogenetic study of chromosomal aberrations, DNA damage test (DNA comet test), Erne method; hypersensitivity reaction of delayed type, determination of mass and cellness of central and peripheral immunity organs, evaluation of phagocytic activity of peritoneal macrophages.

Results. Based on the results of the research, the LLF production technology is scaled, which allows obtaining up to 400 LLF flasks per production cycle. It has been established that LLF at doses of 6 and 24 mg/kg does not cause an increase in the number of chromosomal abnormalities in mice and does not cause DNA damage, in doses of 1, 1–22,0 µg/dish LLF does not show mutagenic activity in the Ames bacterial test, in the range concentrations of 0,062–3,1 µg in the test for promoter activity does not separate intercellular contacts. It is determined that in doses of 6 and 12 mg/kg, LLF does not affect humoral and cellular immunity, does not change the mass and cellularity of the central and peripheral organs of the immune system. LLF, 24 hours after administration at doses of 6 and 12 mg/kg, dose-dependently decreases the phagocytic activity of peritoneal macrophages, which is restored after 7 days.

Conclusion. The technology of LLF production is scaled. In the doses studied, it was found that LLF does not have the ability to promote the process of carcinogenesis and the lack of influence on the humoral and cellular immune response.

Key words: hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine liposomal form, production scaling, mutagenic properties, immunotoxicity

Введение

Применение липосом в качестве систем доставки лекарств в организм человека сегодня является признанным подходом к повышению эффективности лечения, особенно в онкологической практике. В основе эффекта накопления (пассивного транспорта) частиц размером 50–150 нм в опухолях лежит дефектная архитектура образующейся *de novo* сосудистой системы — явление повышенной проницаемости капилляров и нарушенного лимфатического дренажа [1].

В НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разрабатываются липосомальные препараты, получаемые методом включения активной субстанции в состав липидного бислоя. К преимуществам такого подхода в сравнении с инкапсулированием во внутренний объем относят возможность создания наносистем с приемлемой емкостью загрузки для широкого спектра веществ (в частности, для гидрофобных), уменьшение потерь препарата в кровотоке и при слиянии с клеткой, упрощение самой процедуры получения липосом, а также облегчение их внутриклеточной разгрузки за счет прямого трансмембранного переноса лекарства.

Наносистемы способны уменьшить токсичность химиотерапевтических средств с узким терапевтическим индексом, однако ряд данных *in vivo* и *in vitro* исследований показывает, что определенные типы

наночастиц обладают цитотоксичностью, вызывают аллергические и воспалительные реакции, приводят к оксидативному стрессу, повреждению ДНК и фиброзу [2–4].

Проявления реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степеней отмечены у части пациентов при внутривенном введении липосом Doxil®, Ambisome®, DaunoXome® [5]. Такие реакции связаны с активацией липосомами системы комплемента. В связи с этим насущной проблемой представляются исследования по изучению специфической токсичности липосомальных препаратов.

При расширенном доклиническом и клиническом изучении препаратов возникает необходимость в масштабировании производства, а также пересмотре и усовершенствовании имеющейся технологии с целью увеличения выхода продукции и сокращения потерь сырья и материалов. В нормативных документах масштабирование в основном определяется как увеличение объема серий продукции от лабораторного до промышленного и предполагает использование более производительного оборудования и технологического процесса, параметры которого будут соответствовать этому оборудованию и его производительности.

Технология получения липосомальных форм лекарственных препаратов — достаточно трудоемкий процесс, поэтому получение липосом в промышленных

масштабах проблематично для исследователей и производителей всего мира.

В связи с этим на сегодняшний день проведение исследований масштабирования технологии производства и специфической токсичности нового препарата является актуальной задачей.

На базе лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведено масштабирование технологии производства липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия 1,5 мг путем замены некоторого лабораторного оборудования на полупромышленные установки.

Цель исследования — оценка качества опытных образцов ЛЛФ, полученных по масштабированной технологии, в сравнении с образцами, произведенными в лабораторных условиях, а также изучение мутагенных и иммунотоксических свойств.

Материалы и методы

Реактивы для получения липосом: тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия (ТФГА) (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), яичный лецитин (Lipoid GmbH, Германия), PEG-2000-DSPE 18:0 (Lipoid GmbH, Германия), холестерин (Lipoid GmbH, Германия), сахароза («Химмед», Россия), хлороформ, стабилизированный 0,6–1,0 % массовой долей этанола ТУ 2631-001-29483781-04 изм. 1,2 («Химмед», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.15, спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15 (ЗАО «Брынцалов-А», Ферейн, Россия).

Материалы для фильтрации: нейлоновые мембранные фильтры N66, имеющие диаметр 25 и 90 мм и размер пор 0,22; 0,45 и 1,2 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия), фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus с полиэфирсульфоновыми фильтрами, имеющими размер пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США).

Реактивы для исследования мутагенных свойств: Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США), OxiSelect™ Comet Assay Kit (Cell Biolabs, Сан-Диего, Калифорния, США), 2-аминофлуорен (2-АФ) (Sigma, США), бензапирен (Fluka, Англия), гентамицин («ПанЭко», Россия), глюкозо-6-фосфат (Reanal, Венгрия), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота («ПанЭко», Россия), 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазепирин (ДДТДП) («Реахим», Россия), диметилсульфоксид («ПанЭко», Россия), диэтиотрейтол (Amresco, США), дрожжевой экстракт («ПанЭко», Россия), калия гидроксид («Химмед», Россия), калия хлорид («Химмед», Россия), люцифер желтый, литиевая соль (Invitrogen, США), лития хлорид дигидрат («Химмед», Россия), магния хлорид («Химмед», Россия), метиловый спирт («Химмед»,

Россия), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (Sigma, США), натрия ацетат («Химмед», Россия), натрия хлорид («Химмед», Россия), оксоплатин (Lachema, Чехия), параформальдегид («Химмед», Россия), пируват натрия («ПанЭко», Россия), 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА) (Invitrogen, США), уксусная кислота («Химмед», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Sigma, США), спирт этиловый 95 % (ФС.2.1.0036.15), фосфатно-солевой буфер (Flow Laboratories, Англия), цисплатин (Lachema, Чехия).

Реактивы для исследования иммунотоксичности: этиловый спирт 95 % (ФС.2.1.0036.15), фосфатно-солевой буфер («ПанЭко», Россия), питательная среда 199 («ПанЭко», Россия), уксусная кислота («Химмед», Россия), вода для инъекций (ФС.2.2.0019.15), раствор Хэнкса («ПанЭко», Россия), агароза (Helicon, Россия), комплемент морской свинки сухой («Щелковский Биокombинат», Россия), овальбумин (Sigma Aldrich, США), синий Эванса (Panreac, Испания), коллоидная тушь («Гамма», Россия).

Оборудование: весы Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), роторный испаритель Rotavapor R200 (Büchi, Швейцария) с колбой на 2 л, роторный испаритель Heidolph Laborota 20 control safety с отгонной колбой на 20 л (Heidolph, Германия), экструдеры Lipex™ Thermobarrel Extruder на 100 и 800 мл (Northern Lipids Inc., Канада), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция), стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия), низкотемпературная камера NZ 280/75.A (Frigera, Чехия), сублимационная сушка Minifast DO.2 (Edwards, Великобритания), сублимационная сушка Edwards Minifast DO.10 (Ero Electronic S.p.A., Италия), полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия), микроскоп марки Leica, модель TCS SP5 Mid System, анализатор Anthos2020, камера морозильная теплоизолированная (модель КТС-УОМЗ 1809М/04МО).

Лабораторные животные: крысы линии Вистар, мыши линии C57Bl/6 массой тела 20–22 г из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, мыши-самки линии (СВА × C57Bl/6)F1 возраста 6–8 нед массой тела 18–22 г, полученные из филиала питомника «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Клеточные линии. В работе использовали линию immortalized клеток печени крысы IAR-2. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 5 % эмбриональную сыворотку телят (РАА, Австрия) и гентамицин (50 ед/мл), при 37 °C и 5 % CO₂.

Оценка промоторной активности. Исследование промоторной активности проводили с применением теста на угнетение метаболической кооперации, при этом определяли целостность межклеточных контактов, наблюдая за перетеканием люминесцентного индикатора между клетками в монослой [6–8].

Опыты проводили на immortalized клетках печени крысы IAR-2, ЛЛФ исследовали в 4 концентрациях – 3,1; 0,62; 0,31 и 0,062 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду, в качестве положительного контроля вводили ТРА в концентрации 5 нг/мл.

Проведение теста по оценке промоторной активности. Клетки рассеивали на 6-луночные планшеты в количестве 200 тыс. клеток на лунку, перед посевом клеток на дно каждой лунки помещали предварительно простерилизованное покровное стекло. Через 24 ч после посева к клеткам добавляли ЛЛФ и инкубировали в течение 72 ч. За 2 ч до проведения эксперимента клетки, служащие положительным контролем, обрабатывали ТРА в концентрации 1 нг/мл. После окончания инкубации клетки 2 раза отмывали фосфатно-солевым буфером, покрывали раствором люминесцентного индикатора и наносили на монослой клеток 3 параллельных и 1 перпендикулярную царапины хирургическим скальпелем. Затем клетки инкубировали 2 мин при 37 °C во влажной атмосфере без доступа света, 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером в течение 1 мин при комнатной температуре. После промывки клетки покрывали фиксирующим раствором и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Стекла переносили из лунок на предметные стекла и исследовали на флуоресцентном микроскопе Zeiss с фотонасадкой (Axio-plan 2 imaging) с использованием фильтра для FITC-флуоресценции и при увеличении 400.

Критерии оценки промоторной активности. Для каждой исследуемой дозы соединения делали 10 независимых снимков области монослоя клеток, прилегающих к линии царапины. Для каждого снимка определяли порядок клетки, несущей флуоресцентный краситель. Разобшение межклеточных контактов определяли как отношение среднего числа слоев клеток с красителем для каждой концентрации исследуемого препарата к среднему числу слоев клеток с красителем, обработанных растворителем.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента для определения $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стан-

дартная ошибка среднего, с помощью пакета программ Microsoft Excel.

Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса. Тест Эймса предназначен для выявления способности изучаемой ЛЛФ или ее метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных тестерных штаммов [9–12]. В качестве индикаторных микроорганизмов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (генотип hisD3052 rfa uvrB/pKM101) и TA100 (генотип hisG46 rfa uvrB/pKM101). Для учета генных мутаций применяли чашечный метод. При проведении исследования использовали крыс линии Вистар, ЛЛФ вводили в 4 дозах: 1,1; 5,5; 11,0 и 22,0 мкг/чашка. В качестве положительного контроля были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации смесью S9. Для вариантов тестирования без активирующей смеси были использованы N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин и ДДТДП. При применении активирующей фракции S9 ее активность контролировали по эффекту бензапирена и 2-АФ. Мутагенный эффект считался положительным при 2-кратном превышении числа мутантных колоний в опыте по сравнению с соответствующим контролем. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель – дистиллированную воду.

Критериями положительного результата являлись статистически достоверное зависимое от дозы увеличение количества ревертантов или воспроизводимый положительный ответ хотя бы для одной экспериментальной точки.

Определение числа хромосомных aberrаций. Определение числа хромосомных aberrаций проводили с использованием модифицированного в АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» метода С.Е. Ford и J.L. Hamerton на клетках костного мозга на стадии метафазы мышей линии C57Bl/6 массой тела 18–20 г [13]. ЛЛФ вводили внутривенно за 24 ч до начала эксперимента в дозах 1ТД (6 мг/кг) и 4ТД (24 мг/кг) в пересчете на мышь или в течение 5 дней с интервалом между введениями 24 ч в дозе 1ТД в пересчете на мышь. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор, в качестве положительного контроля вводили циклофосамид в дозе 20 мг/кг.

Фиксацию клеток костного мозга проводили спустя 24 ч после последнего введения препарата. На каждый опытный и контрольный варианты брали не менее 5 животных и анализировали по 500 метафазных пластинок, с хорошим разбросом хромосом, без продольных наложений и модульным числом 40 от каждого.

При анализе учитывали следующие показатели: одиночные и парные делеции, хроматидные и хромосомные обмены и другие нарушения хромосом.

Доказательством цитогенетической активности являлось дозозависимое и/или воспроизводимое статистически значимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями по сравнению с контролем. Статистический анализ проводили с помощью теста χ^2 .

Оценка повреждений ДНК методом ДНК-комет. Метод ДНК-комет позволяет регистрировать повреждения структуры ДНК и изучать процесс репарации ДНК на уровне одиночных клеток [14–16]. Эксперименты по оценке повреждений ДНК проводили с использованием OxiSelect™ Comet Assay Kit по протоколу производителя на мышах линии C57Bl/6.

Измерения проводили с помощью компьютерной программы CometScore16, статистическую обработку результатов проводили по каждой экспериментальной точке путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной (ЛЛФ) и контрольной (циклофосамид и физиологический раствор) группах с использованием непараметрических критериев Даннета (% ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста).

Показателем генотоксического действия являлся индекс повреждения (ИП), который вычисляется по следующей формуле [17]:

$$ИП = \frac{\text{ДНК в хвосте в опытной группе}}{\text{ДНК в хвосте в контрольной группе}}.$$

При ИП >2 исследуемый образец обладает генотоксическими свойствами в условиях *in vitro*.

Определение массы и клеточности органов. Мышей забивали на 7-й и 21-й дни после введения препарата с помощью цервикальной дислокации. Извлекали у них тимус, селезенку и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивали и с помощью стеклянного гомогенизатора готовили клеточную взвесь на основе питательной среды 199. Полученную суспензию фильтровали и 2 раза отмывали путем центрифугирования. Костный мозг вытесняли с помощью питательной среды 199 из бедренной кости левой лапки и затем гомогенизировали. Далее подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток (ЯСК) под микроскопом в 3 % уксусной кислоте. Результаты выражали в абсолютных единицах числа ЯСК в органе и в относительных значениях (процент от массы тела) [18, 19].

Оценка влияния ЛЛФ на гуморальный иммунный ответ. В качестве антигена использовали суспензию 3-кратно отмывтых в стерильном физиологическом растворе эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 5×10^7 ЭБ/мышь. ЛЛФ вводили внутривенно, в качестве контроля использовали воду для инъекций. На 5-е сутки после иммунизации определяли число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке (реакция Ерне) [20].

Животных забивали с помощью цервикальной дислокации, извлекали селезенки и готовили клеточную суспензию с помощью стеклянного гомогениза-

тора. Суспендирование проводили в растворе Хэнкса (рН 7,2–7,4) на холоде. Приготовленную суспензию фильтровали и помещали в холодильник.

Расплавленную в дистиллированной воде 2 % агарозу добавляли к равному объему 2-кратно нагретого до 45–48 °С раствора Хэнкса. В приготовленную таким образом агарозу вносили суспензию ЭБ из расчета 70–80 млн клеток на 1 мл агарозной смеси. В предварительно разогретые на водяной бане до температуры 46–48 °С пробирки разливали по 2,75 мл полученной смеси. Затем в пробирки, содержащие агарозу с ЭБ, вводили суспензию селезеночных клеток. Содержимое пробирок встряхивали и выливали на чашки Петри диаметром 100 мм. Осторожным покачиванием и вращением смесь равномерно распределяли по дну чашки. После застывания агарозы чашки помещали в термостат при 37,5 °С на 1 ч. Затем на поверхность агарозы в чашках наливали по 3 мл раствора сухого компонента морской свинки (разведение в физиологическом растворе 1:5) и инкубировали 45 мин в термостате при 37 °С. После инкубации комплемент сливали и проводили подсчет образовавшихся зон гемолиза. При осмотре содержимого чашек в проходящем свете на розовом фоне невооруженным глазом были видны небольшие очаги – участки лизиса эритроцитов («прямые бляшки»). При микроскопии в центре зоны гемолиза была видна 1 клетка, являющаяся продуцентом антител-гемолизаторов. После подсчета зон гемолиза и количества лимфоидных клеток, добавленных к агарозе, вычисляли, сколько антителопродуцентов находилось в исходной суспензии, затем делали перерасчет их количества на весь орган.

Оценка влияния ЛЛФ на клеточный иммунитет в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Влияние ЛЛФ на клеточный иммунитет изучали в реакции ГЗТ по методу И.И. Подоплелова и соавт. [19, 21]. После введения препарата мышей иммунизировали 100 мкг овальбумина в сочетании с 250 мкг синего Эванса в 0,2 мл физиологического раствора в межлопаточную область. Вторую (разрешающую) инъекцию 25 мкг овальбумина в 0,02 мл физиологического раствора производили на 5-е сутки в подушечку задней лапы («опытная» лапа). В контралатеральную лапу вводили 0,02 мл стерильного физиологического раствора («контрольная» лапа). Результаты реакции регистрировали через 24 ч путем определения массы «опытной» и «контрольной» лап. Индекс реакции (ИР) для каждого животного определяли по формуле

$$ИР = \frac{P_o - P_k}{P_k} \times 100 \%,$$

где P_o – масса стопы «опытной» лапы; P_k – масса стопы «контрольной» лапы.

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Через 24 ч после внутривенного введения препарата оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата частиц суспензии 0,05 % коллоидной туши, введенной мышам внутрибрюшинно в объеме 2 мл. Через 10 мин брюшную полость промывали 5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Полученные таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) 3-кратно отмывали, ресуспендировали в 1–2 мл физиологического раствора, подсчитывали концентрацию ЯСК и процент фагоцитирующих клеток под микроскопом. Для определения фагоцитарного индекса измеряли оптическую плотность лунок с лизатом КПЭ. Для этого клетки осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, а осадок КПЭ лизировали дистиллированной водой. Лизаты КПЭ помещали в плоскодонные 96-луночные планшеты и определяли с помощью спектрофотометрического анализатора при длине волны, равной 620 нм, оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами. Результаты выражали в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ, соотнесенную с количеством фагоцитирующих клеток.

Результаты

Получение ЛЛФ с использованием полупромышленных установок и ее исследование. Липосомы получали по методу Бенгема в модификации для гидрофобных субстанций, для оценки возможности масштабирования технологии в технологический процесс были внесены изменения, связанные с использованием полупромышленных установок – роторного испарителя Heidolph Laborota 20 control safety с отгонной колбой на 20 л и экструдера Lipex™ Thermobarrel Extruder объемом 800 мл.

Экспериментальные исследования показали, что оптимальная загрузка вакуумной колбы 20 л для получения легко смываемой липидной пленки составляет 220 мл ТФГА в хлороформном растворе липидов. Увеличение объема приводило к формированию на стенках колбы неоднородной пленки, что требовало длительной сушки от органического растворителя и затем продолжительной регидратации полученной липидной пленки. Указанные обстоятельства осложняли процесс получения ЛЛФ как технологически, так и экономически (увеличение затрат на электроэнергию, износ оборудования). В связи с этим опытным путем был установлен наиболее рациональный объем загрузки отгонной колбы в 200–230 мл.

На этапе образования пленки основными критическими точками технологического процесса являются температура водяной бани, величина вакуума и скорость вращения колбы. Температура водяной

бани не варьируется, а устанавливается на $+37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, что обусловлено физико-химическими свойствами вспомогательных веществ. Величина вакуума задается максимальной и поддерживается автоматически, а вот скорость вращения колбы требуется подобрать оптимальную. Так как данный роторный испаритель способен развивать скорость от 6 до 160 об/мин, проводили ряд экспериментов с использованием различных скоростей вращения. Эмпирическим путем было доказано, что скорость вращения колбы 20 л роторного испарителя для получения однородной липидной пленки должна быть в пределах диапазона от 20 до 40 об/мин. Пленку сушили под вакуумом в течение 2,5 ч до удаления остатков хлороформа.

После получения липидной пленки отключали вакуум, в колбу с пленкой добавляли рассчитанный объем воды для инъекций (300 мл) и продолжали вращение, но скорость его уже не превышала 10–15 об/мин для послыйного смывания пленки и получения однородной липосомальной дисперсии. На этапе разработки лабораторной технологии установили, что смыв пленки раствором криопротектора приводит к образованию трудно измельчаемых липосом, тогда как при применении воды для инъекций процесс измельчения происходит легко и быстро. Поэтому при масштабировании технологии в качестве раствора для гидратации липидной пленки использовали воду для инъекций, которая обеспечивала получение липосомальной дисперсии с приемлемым диаметром везикул (160 ± 20 нм).

После гидратации липидной пленки проводили измельчение липосомальной дисперсии с использованием полупромышленного экструдера на 800 мл. Измельчение проводят путем пропускания дисперсии через фильтры, имеющие поры размером 1,2 мкм (1 раз), 0,45 мкм (1 раз) и 0,22 мкм (5 раз). Затем к измельченной дисперсии добавляли раствор криопротектора, стерилизующую фильтрацию водной липосомальной дисперсии ТФГА с криопротектором проводили с использованием полупромышленного экструдера. Полученную стерильную дисперсию дозировали по 6 мл во флаконы и лиофилизировали, при этом объем наполнения камеры сублимационной установки в отличие от лабораторной технологии был максимальным и составил 400 флаконов.

Полученные по модифицированной технологии липосомы сравнивали по основным качественным показателям (содержание действующего вещества, диаметр липосом и pH полученной дисперсии) с полученными при лабораторном производстве (табл. 1).

При обработке данных, полученных после анализа качества серий ЛЛФ, наработанных с помощью масштабирования технологии, можно сделать вывод, что применение полупромышленных установок на этапах получения липидной пленки и экструзии/

Таблица 1. Сравнительный анализ липосомальных дисперсий, полученных по лабораторной и масштабированной технологиям

| Показатель качества | Лабораторная технология | | Масштабированная технология | |
|--|-------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| | опыт 1 | опыт 2 | опыт 1 | опыт 2 |
| Содержание ТФГА в липосомальной дисперсии, мг/мл | 0,25 ± 0,2 | 0,25 ± 0,3 | 0,25 ± 0,1 | 0,25 ± 0,2 |
| Диаметр липосом, нм | 175 ± 18 | 170 ± 20 | 172 ± 15 | 175 ± 20 |
| pH | 6,9 | 7,1 | 6,8 | 6,6 |

Примечание. pH – водородный показатель; ТФГА – тетра-3-фенилтиофталацианин гидроксиалюминия.

стерилизации, увеличение объема наполнения камеры сублимационной суши не приводят к снижению качества получаемого продукта по сравнению с ЛЛФ, полученной в соответствии с лабораторной технологией. Максимально возможный объем серии ЛЛФ – 400 флаконов.

Исследование мутагенных свойств ЛЛФ

Потенциальную мутагенную активность изучали в соответствии с международным стандартом ISO 10993-3:2003.

Оценка промоторной активности. При исследовании промоторной активности ЛЛФ определяли степень кооперации клеток. При воздействии ЛЛФ в максимальной концентрации 3,1 мкг/мл степень клеточной кооперации составляет 91 % по отношению к клеткам, обработанным ТРА, что статистически достоверно неотличимо от клеток, обработанных дистиллированной водой (рис. 1), это указывает на отсутствие промоторной активности. На рис. 2 представлены

микрофотографии монослоя клеток в области царапины из образцов клеток, обработанных дистиллированной водой, ТРА и ЛЛФ в 4 концентрациях.

Оценка мутагенной активности в тесте Эймса. В табл. 2 и 3 приведены результаты исследований мутагенной активности ЛЛФ на штамме TA100, чувствительном к веществам, которые индуцируют мутации с заменой оснований, а также на штамме TA98, чувствительном к соединениям, индуцирующим мутации со сдвигом рамки считывания. Каждый эксперимент проводили 2-кратно. Показатели контрольных исследований находятся в пределах стандартных уровней, характерных для исследуемых штаммов. В вариантах положительного контроля выявлена высокая активность фракции S9: промутагены 2-АФ и бензапирен индуцируют высокий уровень реверсий. Специфичность мутагенного ответа в системе без активации ферментов микросомных микрооксигеназ подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП и штамма TA100 с мутагеном N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином. Результаты проведенных исследований по изучению мутагенной активности ЛЛФ в тесте Эймса показали, что в диапазоне доз 1,1–22,0 мкг/чашка препарат не вызывает мутаций бактерий в присутствии и/или при отсутствии экзогенной метаболической системы (фракции S9), полученной от млекопитающих.

Определение числа хромосомных aberrаций. Результаты цитогенетического исследования по учету хромосомных aberrаций (рис. 3) оценивали путем регистрации видимых структурных нарушений хромосом на стадии метафазы. ЛЛФ в дозах 1ТД и 4ТД, а также при 5-кратном введении в отличие от циклофосамида статистически достоверно не индуцировала увеличение числа хромосомных аномалий в клетках костного мозга мышей.

Доля клеток, находящихся в кооперации, % относительно образца, обработанного дистиллированной водой

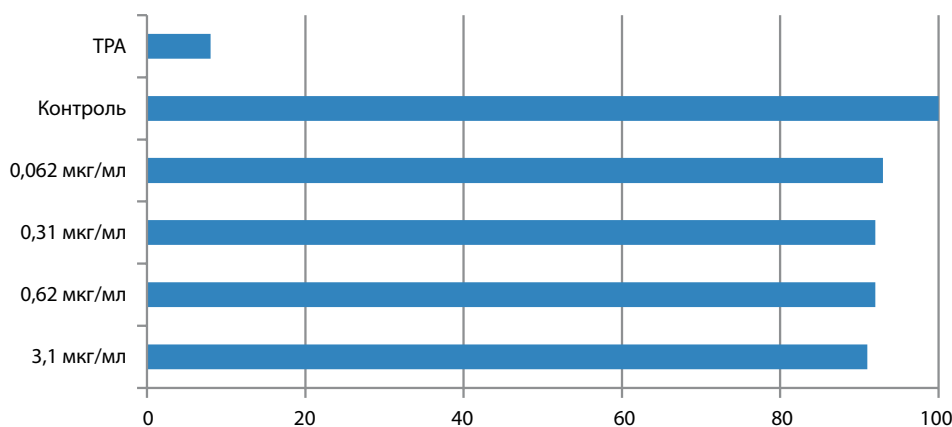


Рис. 1. Полученная на клетках IAR-7 зависимость промоторной активности от концентрации липосомальных лекарственных форм. ТРА – 12-О-тетрадеканолфторбол-13-ацетат

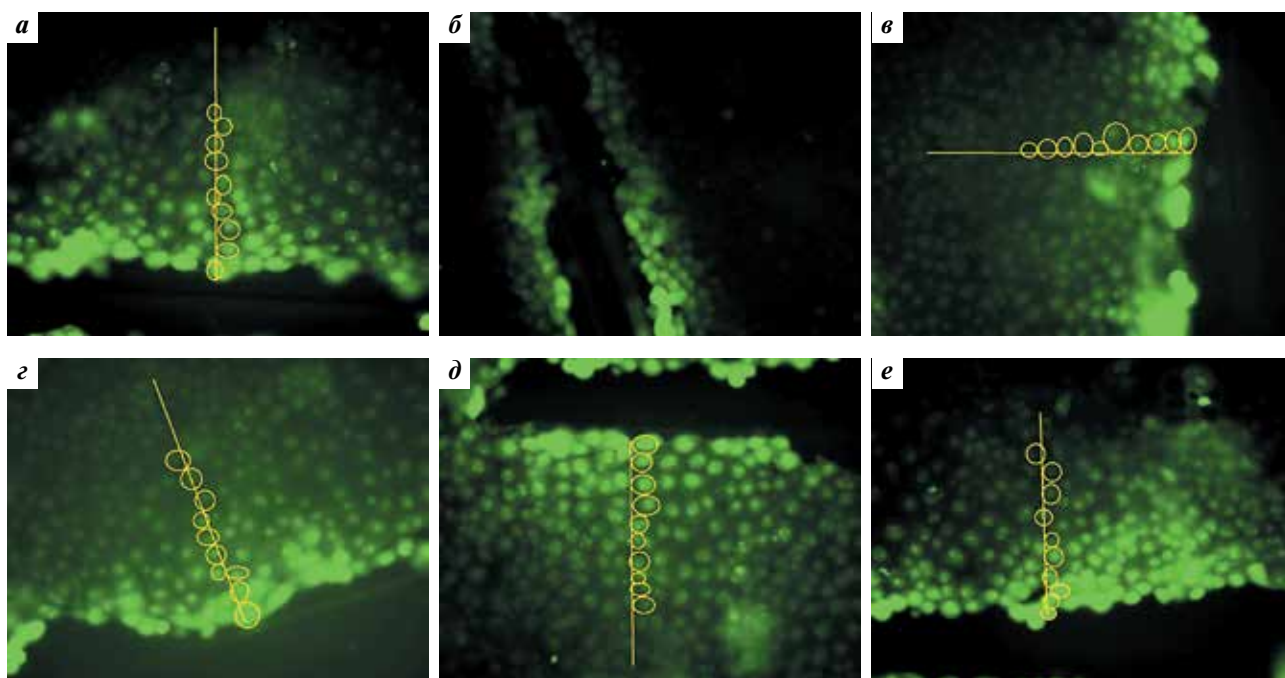


Рис. 2. Микрофотографии монослоя клеток в области царапины из образцов клеток: а – обработанных дистиллированной водой; б – 5 нг/мл 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата; в – липосомальная лекарственная форма (ЛЛФ) в концентрации 3,1 мкг/мл; г – ЛЛФ в концентрации 0,62 мкг/мл; д – ЛЛФ в концентрации 0,31 мкг/мл; е – ЛЛФ в концентрации 0,062 мкг/мл

Таблица 2. Результаты исследования мутагенного действия ЛЛФ на индикаторный штамм бактерии TA100 в тесте Эймса

| Исследуемое вещество | Доза на чашку, мкг | Штамм TA100 | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------------|-------------|-----------|------------|-----------|----|------------|-----------|------------|-----------|----|
| | | –S9 | | | | | +S9 | | | | |
| | | опыт 1 | | опыт 2 | | МА | опыт 1 | | опыт 2 | | МА |
| | | $M \pm m$ | M_1/M_0 | $M \pm m$ | M_1/M_0 | | $M \pm m$ | M_1/M_0 | $M \pm m$ | M_1/M_0 | |
| Контроль фона | 0 | 41 ± 6,4 | 1,0 | 39 ± 6,0 | 1,0 | – | 57 ± 2,0 | 1,0 | 55 ± 3,3 | 1,0 | – |
| БП | 4,4 | | | | | | 403 ± 31,1 | 7,1 | 430 ± 33,3 | 7,8 | + |
| 2-АФ | 22,0 | | | | | | 520 ± 26,7 | 9,1 | 590 ± 13,8 | 10,7 | + |
| НГ | 4,4 | 507 ± 28,7 | 12,4 | 574 ± 14,7 | 14,7 | + | | | | | |
| ЛЛФ | 1,1 | 44 ± 4,4 | 1,1 | 47 ± 3,3 | 1,2 | – | 51 ± 1,1 | 0,9 | 53 ± 2,7 | 1,0 | – |
| | 5,5 | 37 ± 4,0 | 0,9 | 41 ± 2,7 | 1,1 | – | 49 ± 3,8 | 0,9 | 50 ± 1,1 | 0,9 | – |
| | 11,0 | 41 ± 1,6 | 1,0 | 47 ± 2,9 | 1,2 | – | 49 ± 6,7 | 0,9 | 59 ± 13,1 | 1,1 | – |
| | 22,0 | 39 ± 2,4 | 1,0 | 41 ± 2,2 | 1,1 | – | 61 ± 2,0 | 1,1 | 54 ± 1,1 | 1,0 | – |

Примечание. Здесь и в табл. 3: M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. 2-АФ – 2-аминофлуорен; БП – бензапирен; ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма; НГ – N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин. M_1/M_0 – отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле. МА – мутагенная активность препарата («+» – наличие, «–» – отсутствие).

Оценка повреждения ДНК с помощью теста ДНК-комет. При исследовании степени повреждения ДНК ЛЛФ в тесте ДНК-комет была оценена доля «комет» в общем количестве клеток. При введении мышам ЛЛФ в дозах 1ТД и 4ТД было показано, что данное соединение не вызывает статистически досто-

верного увеличения количества клеток-«комет» (рис. 4). В то же время препарат циклофосамид, известный ДНК-повреждающий агент, вызывал достоверное увеличение числа «комет» по сравнению с контрольной группой (33,8 % от общего числа клеток по сравнению с 5,2 % клеток в контрольной группе).

Таблица 3. Результаты исследования мутагенного действия ЛЛФ на индикаторный штамм бактерии TA98 в тесте Эймса

| Исследуемое вещество | Доза на чашку, мкг | Штамм TA98 | | | | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|----|----------------|-----------|----------------|-----------|----|
| | | –S9 | | | | | +S9 | | | | |
| | | опыт 1 | | опыт 2 | | МА | опыт 1 | | опыт 2 | | МА |
| | | $M \pm m$ | M_I/M_0 | $M \pm m$ | M_I/M_0 | | $M \pm m$ | M_I/M_0 | $M \pm m$ | M_I/M_0 | |
| Контроль фона | 0 | $9 \pm 2,0$ | 1,0 | $8 \pm 2,9$ | 1,0 | – | $16 \pm 1,6$ | 1,0 | $13 \pm 2,2$ | 1,0 | – |
| БП | 4,4 | | | | | | $235 \pm 16,7$ | 14,7 | $189 \pm 14,2$ | 14,5 | + |
| 2-АФ | 22,0 | | | | | | $267 \pm 17,8$ | 16,7 | $227 \pm 18,2$ | 17,5 | + |
| ДДТДП | 8,8 | $297 \pm 42,2$ | 33,0 | $320 \pm 33,3$ | 40,0 | + | | | | | |
| ЛЛФ | 1,1 | $10 \pm 1,3$ | 1,1 | $7 \pm 0,4$ | 0,9 | – | $18 \pm 1,8$ | 1,1 | $16 \pm 2,0$ | 1,2 | – |
| | 5,5 | $9 \pm 0,9$ | 1,0 | $9 \pm 0,9$ | 1,1 | – | $18 \pm 3,6$ | 1,1 | $13 \pm 1,6$ | 1,0 | – |
| | 11,0 | $8 \pm 1,6$ | 0,9 | $8 \pm 1,6$ | 1,0 | – | $15 \pm 0,7$ | 0,9 | $13 \pm 2,0$ | 1,0 | – |
| | 22,0 | $12 \pm 1,3$ | 1,3 | $9 \pm 1,8$ | 1,1 | – | $17 \pm 2,2$ | 1,1 | $14 \pm 2,0$ | 1,1 | – |

Примечание. ДДТДП – 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазапирен.

Таблица 4. Характеристики клеток после обработки ЛЛФ в тесте ДНК-комет

| Препарат, концентрация | Средняя длина «хвоста кометы», пиксели | Доля поврежденной ДНК, % | Момент «хвоста кометы» | ИП |
|---------------------------------------|--|--------------------------|-------------------------|--------|
| Физиологический раствор, самцы, 24 ч | $15,5 \pm 2,0$ | $0,00044 \pm 0,00005$ | $0,00004 \pm 0,00001$ | – |
| Физиологический раствор, самцы, 5 сут | $13,3 \pm 2,03$ | $0,000215 \pm 0,000091$ | $0,000055 \pm 0,000019$ | – |
| Физиологический раствор, самки, 5 сут | $13,5 \pm 1,97$ | $0,000236 \pm 0,00009$ | $0,00008 \pm 0,000042$ | – |
| Циклофосфамид, самцы, 20 мг/кг, 24 ч | $49,9 \pm 4,0$ | $3,54 \pm 0,47$ | $3,77 \pm 0,57$ | 8045,5 |
| ЛЛФ, самцы, 1ТД, 24 ч | $14,2 \pm 1,2$ | $0,000300 \pm 0,00011$ | $0,00006 \pm 0,00001$ | 0,68 |
| ЛЛФ, самцы, 4ТД, 24 ч | $14,6 \pm 0,7$ | $0,000390 \pm 0,00010$ | $0,00007 \pm 0,00002$ | 0,89 |
| ЛЛФ, самцы, 1ТД, 5 сут | $15,1 \pm 0,91$ | $0,0000362 \pm 0,000107$ | $0,000037 \pm 0,000007$ | 1,68 |
| ЛЛФ, самки, 4ТД, 5 сут | $17,7 \pm 1,63$ | $0,000297 \pm 0,000092$ | $0,000038 \pm 0,000004$ | 1,28 |

Примечание. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ИП – индекс повреждения; ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма.

Важными данными, получаемыми при проведении теста ДНК-комет, также являются такие характеристики «кометы», как длина «хвоста кометы», доля поврежденной ДНК в клетке, а также момент «хвоста кометы», определяемый как произведение длины «хвоста» на % поврежденной ДНК. Хвост «кометы» представляет собой фракцию относительно низкомолекулярной ДНК, образовавшейся в результате появления разрывов в высокомолекулярной хромосомной ДНК. В нашем случае средняя длина «хвоста кометы» при введении самцам мышей в течение 24 ч физиологического раствора составила $15,5 \pm 2,0$ пикселя, доля поврежденной ДНК и момент «хвоста» были пренебрежимо малы. Значения данных показателей для мышей, получавших ЛЛФ, находились в том же диапазоне, в то время как у самцов, получавших циклофосфамид в дозе 20 мг/кг, доля поврежденной ДНК

составила 3,54 %, а средняя длина «хвоста кометы» – $49,9 \pm 4,0$ пикселя (табл. 4), что подтверждает генотоксические свойства циклофосфамида.

ИП был менее 2,0 для всех опытных групп, получавших ЛЛФ, что указывает на то, что исследуемый образец не обладает генотоксическими свойствами в условиях *in vitro*.

При анализе полученных данных можно сделать вывод, что ЛЛФ в исследованных дозах 1ТД и 4ТД не увеличивает количество хромосомных аномалий у мышей и не вызывает повреждений ДНК в тесте ДНК-комет, в дозах 1,1–22,0 мкг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, а также в тесте на промоторную активность *in vitro* в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг/мл не обладает способностью разобщать межклеточные контакты, что свидетельствует об отсутствии

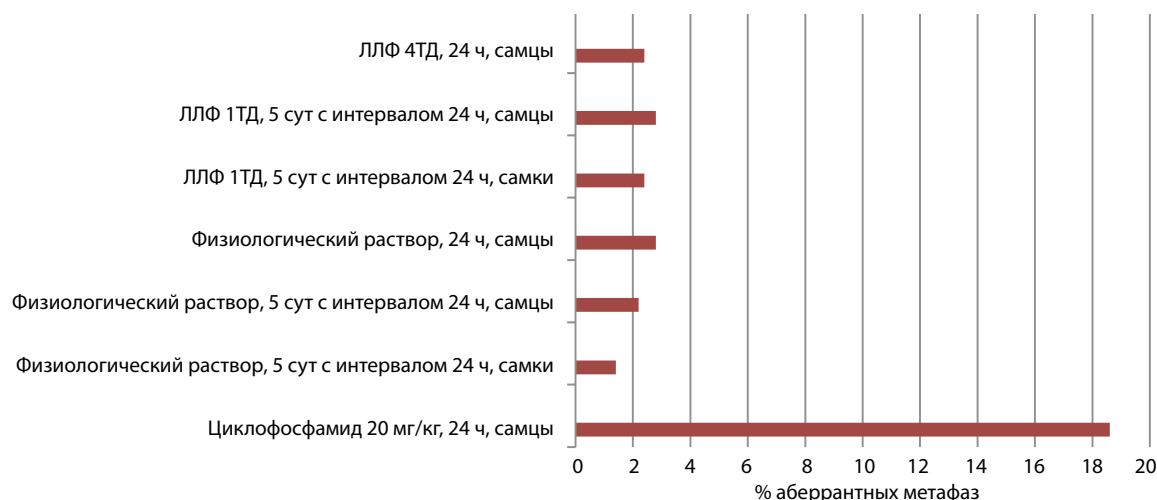


Рис. 3. Результаты исследований влияния липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) на увеличение числа хромосомных аномалий в клетках костного мозга мышей линии C57Bl/6

Таблица 5. Состояние лимфоидных и кроветворных органов на 7-й день после введения ЛЛФ

| Орган иммунной системы | | Контроль* | ЛЛФ, 6 мг/кг | ЛЛФ, 12 мг/кг |
|--|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Селезенка | Количество ЯСК | $3,0 \times 10^8$ | $2,7 \times 10^8$ | $3,1 \times 10^8$ |
| | Масса, мг | 90 | 83 | 86 |
| | Масса, % от массы тела | $0,415 \pm 0,017$ | $0,407 \pm 0,015$ | $0,416 \pm 0,019$ |
| Тимус | Количество ЯСК | $2,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^8$ |
| | Масса, мг | 56 | 49 | 55 |
| | Масса, % от массы тела | $0,259 \pm 0,013$ | $0,272 \pm 0,016$ | $0,268 \pm 0,011$ |
| Костный мозг (количество ЯСК в костном мозге левого бедра) | | $1,1 \times 10^8$ | $0,9 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |

Примечание. Здесь и в табл. 6: ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядросодержащие клетки.

*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

у данного препарата способности промотировать процесс канцерогенеза.

Исследование иммуотоксичности

Влияние ЛЛФ на массу и клеточность лимфоидных и кроветворных органов иммунной системы. На 7-й и 21-й дни после внутривенного введения ЛЛФ оценивали влияние препарата на состояние селезенки, тимуса, костного мозга мышей. Значимых изменений в органах лимфоидной системы после применения ЛЛФ по сравнению с контролем (вода для инъекций) не наблюдали (табл. 5 и 6).

Оценка влияния ЛЛФ на гуморальный иммунный ответ. Оценка гуморального иммунного ответа, т. е. способности иммунной системы к выработке антител в ответ на чужеродные агенты, является наиболее информативной при изучении иммуотоксичности. Оценка проводится в интегральном функциональном тесте: выработка АОК при иммунизации мышей Т-зависимым антигеном — ЭБ.

Данные, приведенные в табл. 7, показывают, что ЛЛФ в исследованных дозах не оказывала влияния на выработку АОК.

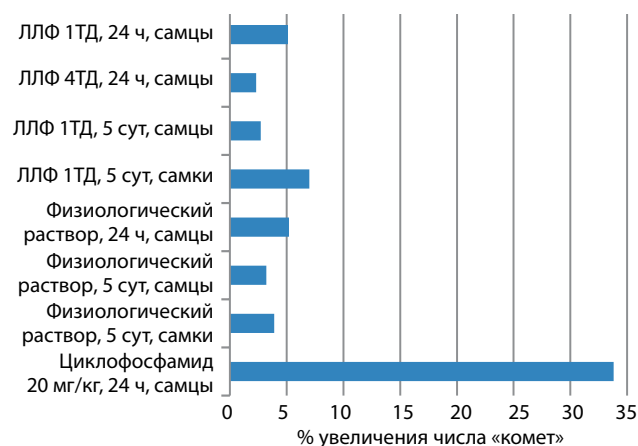


Рис. 4. Влияние липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) на количество клеток «комет»

Таблица 6. Состояние лимфоидных и кроветворных органов на 21-й день после введения ЛЛФ

| Орган иммунной системы | | Контроль | ЛЛФ, 6 мг/кг | ЛЛФ, 12 мг/кг |
|--|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Селезенка | Количество ЯСК | $3,8 \times 10^8$ | $3,6 \times 10^8$ | $3,5 \times 10^8$ |
| | Масса, мг | 100 | 97 | 92 |
| | Масса, % от массы тела | $0,441 \pm 0,017$ | $0,453 \pm 0,020$ | $0,419 \pm 0,015$ |
| Тимус | Количество ЯСК | $3,3 \times 10^8$ | $3,3 \times 10^8$ | $3,1 \times 10^8$ |
| | Масса, мг | 90 | 86 | 89 |
| | Масса, % от массы тела | $0,392 \pm 0,011$ | $0,401 \pm 0,017$ | $0,381 \pm 0,015$ |
| Костный мозг (количество ЯСК в костном мозге левого бедра) | | $1,5 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ |

Таблица 7. Влияние ЛЛФ на количество АОК селезенки мышей

| Группа | Количество ЯСК | Среднее количество АОК на селезенку | Коэффициент по отношению к контролю | p |
|---------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------|
| Контроль* | $4,6 \times 10^8$ | $1990,42 \pm 24,48$ | — | — |
| ЛЛФ, 6 мг/кг | $4,5 \times 10^8$ | $2016,40 \pm 46,51$ | 1,013 | 0,17 |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $4,6 \times 10^8$ | $1950,22 \pm 64,0$ | 0,96 | 0,13 |

Примечание. Здесь и в табл. 8: p — стандартное отклонение; АОК — антителообразующие клетки; ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядродержащие клетки.

*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

Оценка влияния ЛЛФ на клеточный иммунитет в реакции ГЗТ. Реакция ГЗТ дает возможность изучить влияние на продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов, вовлекающих клетки мононуклеарных фагоцитов в иммунный ответ, и оценить влияние на функциональную активность системы Т-клеток иммунитета.

В табл. 8 приведены данные, полученные при оценке влияния ЛЛФ на развитие ГЗТ к овальбумину. Установлено, что ЛЛФ не оказывала влияния на выраженность ГЗТ при внутривенном 1-кратном введении в дозах 6 и 12 мг/кг.

Таблица 8. Влияние ЛЛФ на клеточный иммунный ответ

| Группа | ИР, % | p |
|---------------|----------------|------|
| Контроль* | $7,2 \pm 0,51$ | — |
| ЛЛФ, 6 мг/кг | $7,2 \pm 0,55$ | 0,73 |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $7,2 \pm 0,60$ | 0,85 |

Примечание. ИР — индекс реакции.

*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. При изучении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов через 24 ч после введения ЛЛФ обнаружили, что препарат снижает количество и процент фагоцитирующих клеток, а также дозозависимо уменьшает фагоцитарный индекс КПЭ (табл. 9). Липосомы могут снижать системное коли-

чество макрофагов в организме, так как сами являются объектом фагоцитоза [22]. Поскольку исследуемый препарат является липосомальной формой, вероятно, при введении за 24 ч до исследования фагоцитарной активности он мог быть фагоцитирован, что вызвало снижение количества макрофагов у мышей. В связи с этим определяли длительность сохранения выявленного снижения количества макрофагов у мышей. Через 7 сут после введения препарата (табл. 10) фагоцитарная активность в опытных группах не отличалась от контроля.

Таблица 9. Влияние ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов через 24 ч после введения

| Группа | Фагоцитирующие клетки | | Фагоцитарный индекс |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Количество, $\times 10^6$ | % от общего числа ЯСК КПЭ | |
| Контроль | $1,6 \pm 0,1$ | 3,1 | $0,428 \pm 0,015$ |
| ЛЛФ, 6 мг/кг | $1,1 \pm 0,1$ | 2,5 | $0,375 \pm 0,043^*$ |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $1,0 \pm 0,1$ | 2,5 | $0,286 \pm 0,023^*$ |

Примечание. Здесь и в табл. 10: КПЭ — клетки перитонеального экссудата; ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядродержащие клетки.

* $p < 0,05$ по отношению к контролю. В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

Таким образом, исследование действия ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Таблица 10. Влияние ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов через 7 сут после введения

| Группа | Фагоцитирующие клетки | | Фагоцитарный индекс |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Количество, $\times 10^6$ | % от общего числа ЯСК КПЭ | |
| Контроль | $1,8 \pm 0,1$ | 3,0 | $0,432 \pm 0,019$ |
| ЛЛФ, 6 мг/кг | $1,8 \pm 0,1$ | 3,2 | $0,430 \pm 0,027$ |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $1,9 \pm 0,1$ | 3,0 | $0,438 \pm 0,018$ |

при внутривенном введении в дозах 6 и 12 мг/кг показало, что препарат не оказывает влияния на клеточный иммунитет.

Заключение

По результатам проведенных исследований масштабируется технология получения ЛЛФ, позволяющая получить за 1 производственный цикл до 400 флаконов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (госконтракт № 14.N08.12.0074).

Изучено влияние ЛЛФ на мутагенные свойства и иммунотоксичность. Установлено, что ЛЛФ в исследованных дозах 6 и 24 мг/кг не увеличивает хромосомные аномалии у мышей и не вызывает повреждений ДНК, в дозах 1,1–22,0 мкг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг в тесте на промоторную активность не разобщает межклеточные контакты, что свидетельствует об отсутствии у данного препарата способности промотировать процесс канцерогенеза.

Определено, что в дозах 6 и 12 мг/кг ЛЛФ не оказывает влияния на гуморальный и клеточный иммунитет, не изменяет массу и клеточность центральных и периферических органов иммунной системы. ЛЛФ через 24 ч после введения в дозах 6 и 12 мг/кг дозозависимо снижает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, которая восстанавливается через 7 сут. Следовательно, ЛЛФ в изученных дозах не оказывает иммунотоксического действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Maeda H., Wu J., Sawa T. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Rel* 2000;65:271–84. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
- Wick P., Manser P., Limbach L.K. et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2007;168(2):121–31. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.08.019.
- Ziemba B., Matuszko G., Bryszewska M., Klajnert B. Influence of dendrimers on red blood cells. *Cell Moll Biol Lett* 2012;17(1):21–35. DOI: 10.2478/s11658-011-0033-9.
- Аляутдин Р.Н., Романов Б.К. Рекомендации по оценке безопасности лекарственных средств, содержащих наночастицы. Безопасность и риск фармакотерапии 2015;4:10–22.
- Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(12):1020–30. DOI: 10.1016/j.addr.2011.06.017.
- Brisette J.L., Kumar N.M., Gilula N.B., Dotto G.P. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* 1991;11:5364–71.
- Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W. et al. Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *BioTechniques* 2008;45:33–46. DOI: 10.1128/MCB.11.10.5364.
- Na M.R., Koo S.K., Kim D.Y. et al. *In vitro* inhibition of gap junctional intercellular communication by chemical carcinogens. *Toxicology* 1995;98:199–206. DOI: 10.1016/0300-483X(94)02931-J.
- Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113(3–4):173–215. DOI: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические указания по оценке мутагенных свойств фармакологических препаратов. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. 944 с.
- Белицкий Г.А., Рязанова Ю.А., Абилов С.К. и др. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств. Ведомости Фармакологического комитета 1998;1:21–4.
- Фонштейн Л.М., Абелев С.К., Бобринев Е.В. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем (Методические указания). М., 1983. 34 с.
- Ford C.E., Hamerton J.L. Chromosomes of five rodent species. *Nature* 1956;31:247–54.
- Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
- Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006;1(1):23–9. DOI: 10.1038/nprot.2006.5.
- Budunova I.V., Mittelman L.A., Belitsky G.A. Identification of tumor promoters by their inhibitory effect on intercellular transfer of lucifer yellow. *Cell Biol Toxicol* 1989;5(1):77–89. DOI: 10.1007/BF00141066.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291–8. DOI: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.
- Иванова А.С., Мастернак Т.Б., Мартынов А.И. Принципы изучения иммунотоксического действия фармакологических препаратов. Токсикологический вестник 2010;5:26–31.
- Иванова А.С., Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Мартынов А.И. Принципы оценки иммунологической безопасности фармацевтических продуктов. Биомедицина 2011;(3):94–7.
- Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 1963;140:405.
- Подоплелов И.И., Крылов О.Р., Медуницын Н.В. Эванс синий как адъювант для получения повышенной чувствительности замедленного типа в эксперименте. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1985;6:729.
- Raz A., Bucana C., Fogler W.E. et al. Biochemical, Morphological, and Ultrastructural Studies on the Uptake of Liposomes by Murine Macrophages. *Cancer Res* 1981;41:487–94. PMID: 7448797.