

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ЛИПОСОМАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ВНУТРИВЕННЫХ ИНФУЗИЙ  
«ЛИПОФЕРОЛ» В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Шанская А.И., Пучкова С.М., Хмылова Г.А., Недачина Н.А.

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии*

*ФМБА», Санкт-Петербург, 191024, 2-я Советская ул., д. 16,*

*тел. (812) 274-56-50, E.mail: [bloodscience@mail.ru](mailto:bloodscience@mail.ru)*

**Резюме:** В работе представлены результаты экспериментального изучения инфузионного липосомального раствора с альфа-токоферолом «Липоферол». Установлено, что препарат Липоферол обеспечивает нормализацию кислотно-основного состояния организма, снижает уровень интоксикации, способствует восстановлению структуры клеточных мембран, ингибирует процессы перекисного окисления липидов. Препарат не токсичен, не вызывает анафилактических и аллергических реакций, не оказывает отрицательного воздействия на функциональную активность жизненно важных органов и систему гемостаза. Показана эффективность нового липосомального препарата «Липоферол» в качестве антиоксидантного, антигипоксанта, гепатопротективного, детоксицирующего и мембраностабилизирующего средства в инфузионно-трансфузионной терапии экстремальных состояний.

**Ключевые слова:** альфа-токоферол, Липоферол, антиоксиданты, антигипоксанты, гепатопротектор, интоксикация, лечебная эффективность.

**THE STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND THERAPEUTIC EFFICACY OF  
LIPOSOMAL PREPARATIONS FOR INTRAVENOUS INFUSION "LIPOFEROL"  
IN THE EXPERIMENT**

Shanskaja A.I., Puchkoya S.M., Khmylova G.A., Nedachina N.A.

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia,*

*St.-Petersburg, 191024, 2<sup>nd</sup> Sovietskaya str., 16*

**Summary:** The results of experimental study of liposomal infusion solution with alpha-tocopherol "Lipoferol." It was found that the drug Lipoferol provides the normalization of acid-base balance of

the body, reduces the level of intoxication, the recovery of the structure of cell membranes, inhibits lipid peroxidation. The drug is non-toxic, does not cause anaphylactic and allergic reactions, it does not adversely affect the functional activity of vital organs and hemostasis. The efficiency of the new liposomal drug "Lipoferol" as antioxidant, antihypoxic, hepatoprotective, detoxifying and membrane stabilizing agent in infusion-transfusion therapy of extreme conditions.

**Keywords:** alpha-tocopherol, Lipoferol, antioxidants, antihypoxants, hepatoprotector, intoxication, therapeutic efficiency.

---

## **Введение**

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются одним из механизмов развития необратимых реакций и патологических изменений системы гомеостаза, в частности метаболического ацидоза и нарушений работы жизненно важных органов, таких как печень, сердце, почки и др. [1]. Данные последних лет свидетельствуют, что реакции свободнорадикального окисления играют важную роль в патогенезе последствий экстремальных состояний. Происходит неспецифическое нарушение целостности и функционирования биологических мембран и, как следствие, нарушение метаболизма и деления клеток. Именно процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются одной из основных причин развития необратимой стадии многих заболеваний, во многом определяющих исход заболевания. Применение препаратов антиоксидантного действия в качестве защитного профилактического или лечебного средства при патологических состояниях с резким усилением свободнорадикального окисления патогенетически обосновано.

Другим фактором, определяющим смертность пациентов, являются отравления химической и нехимической (бактериальной) этиологии. При этом связанные с интоксикацией последствия обусловлены не только токсическим действием отравляющего вещества, но и сбоями в защитных реакциях организма, часто наносящих больший вред, чем специфический фактор. Так, развивающийся вследствие экзогенного отравления синдром эндотоксикоза считается одной из основных причин возникновения полиорганной недостаточности, задержки реабилитации больных и высокой летальности [1, 2].

Все это определяет необходимость применения при терапии экстремальных состояний инфузионных растворов, не только способствующих волюмо-, гемореокоррекции,

нормализации электролитного баланса и кислотно-основного равновесия (КОС), но и обладающих прямым воздействием на тканевой метаболизм.

В эксперименте и в клинической практике интенсивной терапии критических состояний различного генеза доказана эффективность применения препаратов метаболического действия: антиоксидантов, антигипоксантов и детоксицирующих веществ. К таким препаратам относится и разработанный в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии «Липоферол» – липосомальный препарат для внутривенного введения, представляющий собой наносистему из фосфолипидов сои и антиоксиданта альфа-токоферола (витамина Е) с размером основной массы липосомальных частиц 60-80 нм [3]. Лечебное действие Липоферола определяется сочетанием в нем сильного антиоксиданта альфа-токоферола ( $\alpha$ -ТФ) с высокоочищенными фосфолипидами растительного происхождения, обладающими богатым энергетическим потенциалом. Согласно данным ВОЗ до 80% пациентов отдают предпочтение именно лекарственным средствам растительного происхождения. Так, вводимые соевые фосфолипиды, способствуя восстановлению структуры и липидного профиля биологических мембран, не накапливаются и полностью утилизируются в организме. Терапевтический эффект липосомальных наночастиц из природных фосфолипидов связывают с неспецифической адсорбцией на их поверхности продуктов распада и удалением их из кровяного русла в органы РЭС. Фосфолипиды оказывают прямое ферментативное ингибирование процессов перекисного окисления липидов, путем встраивания и замещения дефектов в клеточных мембранах. В основе дезинтоксикационного, мембраностабилизирующего и антирадиационного действия липосомальных препаратов лежит свойство полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, связывать токсины и активные химические радикалы. Фосфолипиды, являясь благоприятным субстратом окисления, в то же время участвуют в синергическом увеличении эффективности действия антиоксиданта – альфа-токоферола. Одним из способов доставки  $\alpha$ -ТФ в клетку через её мембрану является включение его в бислои липосом. Липосомальная форма антиоксиданта обеспечивает повышение лекарственной эффективности и пролонгирование действия.

Давно известен широкий спектр действия витамина Е и необходимость его применения при различных патологиях. Витамин Е обладает антиоксидантными свойствами, поглощает радикалы, обезвреживает токсические продукты, повышает защитную способность Т-лимфоцитов. Мембранопротекторный эффект витамина Е связан с проявлением антиоксидантных свойств за счет прямого взаимодействия его боковой изодентальной цепи с

полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидных мембран. Такое взаимодействие приводит к повышению прочности мембран митохондрий и появлению у них повышенной устойчивости к действию токсических продуктов ПОЛ.

Под влиянием альфа-токоферола происходит синтез сократительных белков в скелетных, и гладких мышцах, белков слизистых оболочек, плаценты, синтез ферментов печени и гонадотропных гормонов, а также синтез гема, входящего в состав гемоглобина, миоглобина, цитохромов. Кроме того, витамин Е активирует эритропоэз.

В отечественной и зарубежной литературе не описаны липосомальные препараты с  $\alpha$ -ТФ для внутривенного введения. Выпускаемый отечественной промышленностью  $\alpha$ -ТФ рекомендуется только как витаминный препарат для приема per os. Альфа-токоферол оказывает антиоксидантное действие, участвует в биосинтезе гема и белков, пролиферации клеток, тканевом дыхании, предупреждает гемолиз эритроцитов, препятствует повышению проницаемости и ломкости капилляров (4, 5). Официальный препарат имеет определенные противопоказания для медицинского применения. Так,  $\alpha$ -ТФ при таком методе введения всасывается медленно, усваивается в организме когда не нарушен обмен белков и желчных кислот, может вызывать аллергические реакции, и применяется с осторожностью у пациентов с проблемами со стороны сердечно-сосудистой и свертывающей систем (кардиосклероз, инфаркт миокарда, гипопротромбинемия).

Липосомальный препарат с альфа-токоферолом «Липоферол» лишен этих недостатков, так как известно что, липосомальные формы лекарственных препаратов нетоксичны, биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, благодаря своему строению и составу, имеют высокое сродство к мембранам клеток, что позволяет доставлять лекарство внутрь клетки. Внутривенный способ введения альфа-токоферола обеспечивает наиболее быстрое и эффективное воздействие антиоксиданта.

### **Цель исследования.**

Проведение экспериментального исследования липосомального препарата «Липоферол»: изучить безвредность и лечебную эффективность на моделях токсического гепатита и синдрома сдавления у крыс, а также на модели ожогового шока у кроликов. Оценить антиоксидантные, антигипоксантные, гепатопротективные и детоксицирующие свойства Липоферола по различным показателям: биохимическим, кислотно-основного состояния, перекисного окисления липидов и маркерам эндотоксемии.

## Материалы и методы

Объектом исследования был липосомальный препарат «Липоферол» для внутривенного введения, разработанный в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии (РосНИИГТ, Санкт-Петербург), в состав которого входят соевые фосфолипиды и альфа-токоферол.

Экспериментальные исследования выполнены на 70 белых беспородных крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г и на 73 кроликах породы «Шиншила» массой 2-3 кг, полученных из Федерального государственного бюджетного учреждения питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Для опытов отбирали внешне здоровых животных, у которых фоновые показатели периферической крови (общее количество лейкоцитов, эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, гематокрит, гемограммы) были в пределах физиологической нормы для данного вида животных. Животных содержали в условиях вивария по одному (кроликов) и по 5 особей (крысы) в одной клетке при свободном доступе к воде и корму [6]. Все исследование на животных проводили в соответствии с общепринятыми правилами GLP. Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» [7]. При завершении научных исследований выведение животных из опыта проводили с соблюдением требований гуманности согласно приложению № 4 к Правилам [7] о «Порядке проведения эвтаназии (умерщвления животного)».

Изучение острой, хронической токсичности и специфической активности проводили на различного вида животных (200 мышей, 89 крыс, 123 кролика, 40 морских свинок, 7 собак), в соответствии с нормативными документами [8, 9]. До начала исследования и через 1 месяц ежедневного введения изучаемого средства оценивались следующие показатели: общее состояние животных, поведение, динамика массы тела, потребление воды и корма; общий неврологический статус; функциональное состояние ЦНС, сердца, печени, почек. В конце экспериментов проводили биохимический анализ крови и аутопсию после эвтаназии животных, гистологическое исследование органов с определением индексов по отношению к массе тела.

Исследование лечебной эффективности препарата «Липоферол» проводили при синдроме длительного сдавления (СДС) у крыс, на модели токсического гепатита у крыс, вызванного введением 4-х хлористого углерода ( $CCl_4$ ) и на модели ожогового шока у кроликов.

Моделировали СДС сжатием мягких тканей задних конечностей крыс в течение 4-х часов. За один час до прекращения травмирования животным внутривенно вводили липосомальный

препарат в дозе 50 мг/кг массы тела, а контрольной группе вводили такой же объем физиологического раствора. Каждая группа состояла из 20 животных. Изучали активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), а также определяли в тканях печени, почек, миокарда и мозга содержание малонового диальдегида (МДА) как конечного продукта процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Токсический гепатит моделировали следующим образом: животным в течение 4-х суток ежедневно подкожно вводили 50% раствор  $\text{CCl}_4$  в дозе 2,5 мл/кг массы тела животного. Липоферол вводили внутривенно в течение 4-х дней спустя 24 часа после последнего введения  $\text{CCl}_4$  в дозе 50,0 мг/кг массы тела животного. Гематологические показатели периферической крови изучали спустя сутки после окончания введения липосомального препарата. Все животные были разделены на 4 группы, в каждой группе было по 8 животных. Изучали биохимические показатели функционального состояния печени, определяли продолжительность гексеналового сна у животных, клиренс бромсульфалеина, показатели процессов перекисного окисления липидов до развития токсического гепатита, при развитии гепатите и после лечения Липоферолом и нативным  $\alpha$ -ТФ.

Опыты с ожоговым шоком проводили на кроликах обоего пола (73 животных) массой 2,0-3,0 кг. Ожог наносили специально сконструированным аппаратом, вмонтированным в латунный корпус с никелевым покрытием. Для нанесения ожогов нагретый до 200-240° С латунный корпус аппарата слегка прижимали к предварительно деэпилированной коже кролика. Время экспозиции 3 секунды. При таком времени экспозиции прогревается только кожа. Площадь ожога равнялась 18-20% от общей поверхности тела животного. Было поставлено 3 серии экспериментов: 1 - животные с ожогом без лечения, 2 - животные, леченные физиологическим раствором (15 мл/кг массы животного) и 3 - животные, которым вводили липосомальную дисперсию (6 мл/ кг массы животного). Лечение начинали через 30 минут после нанесения термической травмы. Изучали показатели гемодинамики, кислородного режима организма, кислотно-основного состояния, количество пептидов среднемoleкулярной массы (СММ), процессы ПОЛ и выживаемость. Исследования проводили совместно с сотрудниками лаборатории экспериментальной патологии института Н.И.Кочетыговым и М.И.Ремизовой и др. [10].

Эффективность терапии оценивали после окончания введения Липоферола по уровню следующих маркеров: рН крови, пептидов средней молекулярной массы (СММ); продуктов ПОЛ – диеновые конъюгаты (ДК), малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа (ОШ); аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Уровень СММ

определяли по методике Малаховой [11] с пошаговой регистрацией абсорбции ТХУ-супернатанта в УФ-области спектра на спектрофотометре. Контроль качества биохимических исследований проводили по стандартам крови фирмы «Лахема» (Чехия). Гематологические и биохимические показатели крови определяли общепринятыми методами в течение всего опыта, используя автоматический счетчик клеток, ФЭК, биохимический анализатор, спектрофотометр, микроскоп.

Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики для множественных сравнений с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Анализ выполнялся для каждой группы отдельно. Статистически достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и их обсуждение.**

Препарат Липоферол представляет собой липосомальную дисперсию для внутривенных инфузий, состоящую из соевых фосфолипидов (лецитина и кислых фосфолипидов сои) и антиоксиданта альфа-токоферола.

Полученные серии препарата, протестированные по следующим физико-химическим параметрам: рН, размер везикул, перекисное число, стерильность, пирогенность, токсичность, соответствовали всем требованиям, предъявляемым к растворам для внутривенных введений.

При изучении безвредности препарата Липоферол не удалось установить ЛД<sub>50</sub>, так как введение препарата в дозе в 20 раз превышающую терапевтическую дозу не приводило к гибели животных. Полученные данные свидетельствуют о малой токсичности препарата и широком диапазоне между ЛД<sub>50</sub> и терапевтической дозой. Отсутствие острой и хронической токсичности Липоферола было подтверждено на 3-х видах животных. Общее состояние животных, получавших препарат, оставалось удовлетворительным. В течение всего периода исследований гибели животных не наблюдалось. Выявлено, что многократное введение Липоферола не вызывало изменений в массе тела животных в течение всего периода исследований, не оказывало существенного влияния на потребление корма и воды. Как показали проведенные исследования, Липоферол в испытанных дозах в 4-недельных субхронических опытах на кроликах хорошо переносился животными и не влиял на гематологические показатели, функциональное состояние основных органов и систем организма подопытных животных (по данным использованных биохимических тестов и ЭКГ). Отсутствие токсических повреждений внутренних органов и местнораздражающего

действия, связанных с введением препарата «Липоферол», подтверждено результатами патоморфологических исследований, проведенных после окончания экспериментов.

В результате экспериментов было показано, что при введении препарата интактным животным никаких побочных эффектов выявлено не было. Липоферол не оказывал отрицательного влияния на функциональную активность жизненно важных систем организма, метаболизировался, не вызывал аллергических реакций.

Лечебное действие липосомального препарата «Липоферол» определяется сочетанием в ней сильного антиоксиданта с высокоочищенными фосфолипидами, обладающими богатым энергетическим потенциалом. Липосомальная форма антиоксиданта обеспечивает повышение лекарственной эффективности и пролонгирование действия. Вводимые фосфолипиды, способствуя восстановлению структуры и липидного профиля биомембран, полностью усваиваются в организме.

Исследование лечебной эффективности Липоферола проводили при синдроме длительного сдавления (СДС) у крыс. Эта патология наиболее часто встречается в очагах техногенных аварий и при землетрясениях, когда пострадавшие длительное время находятся под завалами разрушенных зданий. СДС характеризуется тяжелой ишемией, при которой резко усиливаются процессы перекисного окисления липидов. Особый интерес представляло изучение влияния Липоферола на процессы ПОЛ в тканях жизненно важных органов экспериментальных животных (печень, почки, мозг, миокард). Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1

Процессы перекисного окисления липидов в различных тканях крыс  
при синдроме длительного сдавления  
(M m)

Группа животных и вводимые препараты	Показатели		
	СОД ед. акт/мг белка	Каталаза мкмольН <sub>2</sub> О <sub>2</sub> / мин. мг белка	МДА нмоль/ мг ткани
	печень		
Липоферол	18,70±0,16*	27,70±1,18*	3,44±1,22*
Физиологический р-р	21,80±0,50	19,80±0,10	9,52±0,41
Интактные животные	17,60±1,12	26,40±1,52	3,46±0,06
	почки		
Липоферол	18,70±0,16*	27,70±1,18*	3,44±1,22*
Физиологический р-р	21,80±0,50	19,80±0,10	9,52±0,41
Интактные животные	17,60±1,12	26,40±1,52	3,46±0,06
	миокард		



Липоферол	17,00±0,42*	26,00±0,84*	4,58±1,15*
Физиологический р-р	20,70±1,20	20,00±0,10	9,34±0,02
Интактные животные	17,50±0,03	26,51±1,04	3,51±0,04
	МОЗГ		
Липоферол	16,90±0,17*	26,10±0,92*	4,64±0,03*
Физиологический р-р	20,70±0,61	19,4±0,82	8,84±0,22
Интактные животные	17,40±1,11	27,00±0,52	3,46±0,07

Примечание: статистическая достоверность к контролю с физ. раствором -  $p < 0.01$

Как видно из данных таблицы, Липоферол достоверно снижает количество конечных продуктов перекисного окисления липидов малонового диальдегида (МДА), а также повышает содержание супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в тканях жизненно важных органов (печень, почки, сердце, мозг) при синдроме длительного сдавления. Практически все изучаемые показатели приближались к показателям у интактных животных, что свидетельствует о нормализации процессов ПОЛ.

Для сравнения антиоксидантного действия при СДС липосомальной формы альфа-токоферола (Липоферола) с нативной рассчитывали коэффициент антиоксидантной защиты (Каоз) по формуле:

$$\text{Каоз} = \text{СОД} \cdot \text{каталаза} / \text{МДА}.$$

Данные приведены в таблице 2.

Таблица 2

Коэффициент антиоксидантной защиты в различных тканях крыс  
при синдроме длительного сдавления  
(M m)

Группа животных и вводимые препараты	Каоз (усл. ед.)	
	в печени	в почках
Липоферол (липосомальный препарат с $\alpha$ -токоферолом)	147,37±4,32*	150,58±2,41*
Нативный $\alpha$ -токоферол	112,06±4,45	112,20±4,32
Физиологический раствор	47,66±2,64	46,68±2,10
Интактные животные	144,76±2,50	134,34±1,54

Примечание: статистическая достоверность липосомальной формы к нативной -  $p < 0.05$

Из таблицы видно, что коэффициент антиоксидантной защиты в тканях печени и почек животных восстанавливался до нормальных величин после введения Липоферола. Показано, что липосомальная форма альфа-токоферола обладает по сравнению с обычной формой на 30% более высоким антиоксидантным действием.

Исследование лечебной эффективности проводили и на модели токсического гепатита у крыс, вызванного введением 4-х хлористого углерода (CCl<sub>4</sub>). Известно, что заболевания печени как вирусной, так и токсической этиологии характеризуется патологическими сдвигами в структуре ее клеточных и субклеточных мембран, вызванными интоксикацией и активацией процессов ПОЛ. Интоксикация сопровождается различными хирургические, терапевтические, инфекционные, онкологические заболевания, отягощая их течение. Метаболические нарушения, возникающие в организме, приводят к накоплению токсических продуктов. Для ускорения регенерационных процессов в печени показано введение детоксицирующих и антиоксидантных инфузионных растворов.

Результаты исследований функционального состояния печени, биохимических показателей периферической крови и процессов перекисного окисления липидов при лечении токсического гепатита у крыс приведены в таблицах 3-4.

Таблица 3

Биохимические показатели функционального состояния печени в крови  
при токсическом гепатите у крыс  
(M m)

Группа животных	АсАТ (мккат/л)	АлАТ (мккат/л)
Леченные Липоферолом	1,33±0,01*	0,75±0,02*
Животные с гепатитом	1,60±0,02	0,95±0,01
Интактные животные	1,16±0,03	0,58±0,02

Примечание: статистическая достоверность к контрольной группе - p 0.01

Существенно снижаются показатели АлАТ и АсАТ в крови крыс, что свидетельствует об улучшении экскреторной функции печени и детоксицирующем действии препарата.

Таблица 4

Процессы перекисного окисления липидов в ткани печени

при токсическом гепатите у крыс

(M m)

Группа животных	Гидроперекиси ед	МДА мкмоль/г	СОД ед/мг	Каталаза ед/мг
Леченные Липоферолом	0,081±0,001*	18,2±0,1*	0,94±0,03*	0,162±0,006*
Животные с гепатитом	0,197±0,002	31,2±0,5	0,06±0,01	0,279±0,009
Интактные животные	0,060±0,002	21,3±0,3	1,11±0,02	0,057±0,010

Примечание: статистическая достоверность к контрольной группе -  $p < 0.01$

Из табл. 4 видно, что после введения липосомального препарата с альфа-токоферолом достоверно снижается содержание токсических продуктов перекисного окисления липидов (МДА и гидроперекиси). Увеличивается активность СОД и каталазы, что говорит о восстановлении системы антиоксидантной защиты и антиоксидантном действии препарата «Липоферол».

Детоксицирующее действие Липоферола подтверждено данными при изучении длительности гексеналового сна. Активность микросомальных монооксигеназ, метаболизирующих липидорастворимые чужеродные соединения, определяют по тесту длительности гексеналового сна. Сокращение длительности гексеналового сна указывает на индукцию, а увеличение - на ингибирование этой ферментативной системы. Если продолжительность сна достоверно сокращается под влиянием исследуемого препарата, можно считать, что он активирует антитоксическую функцию печени, в результате чего концентрация введенного гексенала в крови понижается и животные просыпаются.

Так, у интактных животных продолжительность гексеналового сна составила 16,0±1,8 мин, при остром поражении печени – 199,1±25,0 минут, а при внутривенном введении животным липосомальной дисперсии с альфа-токоферолом – 119,0±13,1 минуты. Введение нативной формы альфа-токоферола практически не влияло на длительность гексеналового сна (196,7±18,0). В ходе эксперимента было показано, что липосомальная форма альфа-токоферола оказывала положительное влияние на обезвреживающую функцию печени животных, способствовала существенному снижению уровня эндогенной интоксикации, что проявлялось в укорочении длительности гексеналового сна.

Клиренс бромсульфалеина относится к числу наиболее информативных и чувствительных методов исследования поглотительно-выделительной функции печени. При

повреждении клеток печеночной паренхимы и ретикуло-эндотелиальной системы происходит снижение скорости выведения бромсульфалеина. Нами были получены данные о влиянии Липоферола на скорость выведения бромсульфалеина из крови животных. В контрольной группе (животные с острым гепатитом) скорость выведения была равна 1,14 ммоль/мл/мин, в группе животных, получавших нативную форму альфа-токоферола, она составила 2,82 ммоль/мл/мин, а у животных, которым вводили липосомальную форму альфа-токоферола – 3,48 ммоль/мл/мин (по отношению к контролю  $p < 0.01$ ). Увеличение скорости выведения краски из крови животных после внутривенного введения Липоферола говорит о нормализации поглотительной и экскреторной функции печени и о восстановлении проницаемости клеточных мембран.

Учитывая, что длительность гексеналового сна и клиренс бромсульфалеина тесно связаны с функцией лизосом печени, и в частности, системы цитохрома P-450, полученные данные свидетельствуют о коррекции метаболических процессов биотрансформации в печени крыс и восстановлении процессов клеточного дыхания в митохондриях печени, т.е. об антигипоксическом действии Липоферола.

Высоконенасыщенные фосфолипиды, входящие в состав Липоферола, проникают в клетки, корригируя нарушенный фосфолипидный состав мембран гепатоцитов. Метаболический эффект Липоферола проявляется благодаря восстановлению структуры мембран клеток, в результате чего улучшаются ее рецепторные свойства, увеличивается чувствительность к вводимым лекарственным средствам.

Таким образом, показано, что Липоферол оказывает гепатопротективное действие при токсическом поражении печени, улучшает функции печени, обладает детоксицирующими свойствами, ингибирует процессы ПОЛ. Препарат оказывает более высокий гепатопротективный эффект по сравнению с официальным раствором альфа-токоферола, вводимым *per os*.

Аналогичные данные получены при превентивном введении (за 2 часа до введения  $CCl_4$ ) липосомального препарата с альфа-токоферолом: отмечали достоверное снижение количества продуктов ПОЛ, усиление системы антиоксидантной защиты организма, восстановление функциональной активности гепатоцитов, снижение уровня интоксикации и нормализация метаболических процессов.

С целью изучения влияния препарата «Липоферол» на клетки крови доноров были проведены исследования в опытах *in vitro*. Консервированную кровь доноров инкубировали с Липоферолом в течение 30 минут при  $37^\circ C$ . Методом электрофореза изучали

электрофоретическую подвижность и дзета-потенциал эритроцитов. Опыты показали, что инкубирование консервированной крови с Липоферолом приводило к достоверному увеличению отрицательного значения дзета-потенциала и электрофоретической подвижности эритроцитов на 20%, что свидетельствует об антиагрегационных свойствах липосомального препарата. Морфологический анализ показал, что добавление Липоферола во взвесь эритроцитов при различных сроках хранения крови способствует преобладанию нормальных (дисковидных) форм и обеспечивает стабильное поддержание отрицательного заряда эритроцитов. Липосомальный препарат с альфа-токоферолом отчетливо уменьшал степень нарастания в крови содержания свободного гемоглобина и процента осмотически неустойчивых клеток. Липоферол снижал также агрегацию тромбоцитов в крови доноров. Механизм действия, по-видимому, связан с тем, что отрицательно заряженные униполярные липосомальные наночастицы сосредоточены в плазме около клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов) и отталкивают их друг от друга, тем самым препятствуют их агрегации, слипанию и седиментации. Полученные результаты свидетельствуют о мембраностабилизирующем действии препарата «Липоферол».

Проведено изучение липосомального инфузионного раствора Липоферол на модели ожогового шока у кроликов. По данным ВОЗ среди всех видов травм ожоги занимают 3 место. При ожоговой болезни терапия направлена на детоксикацию токсических продуктов тканевого и энтерогенного происхождения, нормализацию основных функций жизненно важных органов (сердца, печени, почек), показателей центральной гемодинамики, извлечение из крови пептидов среднемолекулярной массы (СММ), снижение интенсивности процессов ПОЛ. Основным методом борьбы с интоксикацией является инфузионно-трансфузионная терапия.

В комплексной противошоковой терапии ожоговой болезни для поддержания жизненно важных систем организма определенное место отводится применению витаминов (А, С, витамины группы В и др.), а также витамину Е (альфа-токоферол), обладающему выраженными антиоксидантными свойствами (12, 13). К тому же, альфа-токоферол показан к применению при термической травме, так как способствует уменьшению инсулинорезистентности и улучшению утилизации глюкозы (14).

Поставлено 3 серии экспериментов: 1 - животные с ожогом без лечения, 2 - животные, леченные физиологическим раствором (15 мл/кг массы животного) и 3 - животные, которым вводили липосомальный препарат в терапевтической дозе (6 мл/ кг массы животного). Лечение начинали через 30 минут после нанесения термической травмы (ожог контактным

способом 18-20% поверхности тела). Изучали показатели гемодинамики, кислородного режима организма, кислотно-основного состояния, количество среднемолекулярных пептидов, процессы ПОЛ и выживаемость.

Термическая травма вызывала у кроликов выраженные нарушения кислотно-основного состояния. В 2,5 раза по сравнению с исходным уменьшалось содержание стандартного бикарбоната, увеличивался дефицит буферных оснований. Происходили и значительные изменения системной гемодинамики. Ударный объем сердца (УО) через 30 минут после ожога снизилось до  $44 \pm 2\%$  от исходного, а через 4 часа он составил  $22 \pm 2\%$  (табл. 5).

Таблица 5

Ударный объем сердца (% к исходным) при ожоговом шоке у кроликов  
(M m)

Группа животных	Исходные данные мг/мл	Время после ожога (в часах)	
		1/2	4
I группа Ожоговый шок	$1,00 \pm 0,02$	$44 \pm 2$	$22 \pm 2$
II группа Физ. раствор	$1,02 \pm 0,02$	$42 \pm 4$	$38 \pm 5$
III группа Липоферол	$0,95 \pm 0,02$	$43 \pm 4$	$54 \pm 4^*$

Примечание: статистическая достоверность к контролю с физ. раствором -  $p = 0.05$

Инфузии физиологического раствора не приводили к существенной коррекции системной гемодинамики, однако УО снижался не в такой степени как у животных с ожоговым шоком (I группа). При введении Липоферола уже через 2 часа УО возрастал с  $43 \pm 4\%$  до  $64 \pm 4\%$  от исходной величины. В дальнейшем через 4 часа наблюдалось незначительное снижение УО, но значения его продолжали оставаться выше, чем в контрольных сериях (табл. 5).

Отмечалось и улучшение кислородного режима организма после введения липосомального препарата. Содержание оксигемоглобина и напряжение кислорода в венозной крови не уменьшалось в такой степени, как это наблюдали при ожоговом шоке без лечения и при введении животным физиологического раствора. Эти изменения могли быть связаны с коррекцией метаболических нарушений, снижением проницаемости биомембран, в частности лизосом и митохондрий, а также улучшением деятельности сердца. Полученные данные свидетельствуют, что при введении липосомального препарата «Липоферол» происходит восстановление показателей системной гемодинамики и кислородного режима организма.

При ожоговом шоке у животных отмечалась активация процессов ПОЛ, что подтверждалось увеличением в крови конечных продуктов пероксидации – оснований

Шиффа (ОШ). Введение физиологического раствора процессы пероксидации не купировали (табл. 6). Спустя 4 часа после введения липосомального препарата содержание ОШ в крови достоверно снижалось.

Таблица 6

Содержание оснований Шиффа (усл. ед./мг липидов) при ожоговом шоке у кроликов  
(M m)

Группа животных	Исходные данные	Время после ожога (в часах)	
		1/2	4
I группа Ожоговый шок	14,4±1,2	18,7±0,5	22,9±1,1
II группа Физ. раствор	13,5±0,6	17,9±0,41	19,8±0,9
III группа Липоферол	15,8±0,8	20,5±0,3	17,1±0,2*

Примечание: статистическая достоверность к контролю с физ. раствором -  $p < 0.05$

Показателем степени интоксикации при ожоговой болезни является количество пептидов среднемoleкулярной массы в крови. Удаление СММ из крови уменьшает тахикардию, энцефалопатию, улучшает экскреторную функцию почек, стимулирует перистальтику кишечника.

В крови обожженных животных нарастало содержание СММ, что указывает на увеличение токсичности плазмы (табл. 7).

Таблица 7

Содержание среднемoleкулярных пептидов (усл. ед. при  $\lambda = 254$ )  
при ожоговом шоке у кроликов  
(M m)

Группа животных	Исходные данные	Время после ожога (в часах)	
		1/2	4
I группа Ожоговый шок	0,085±0,002	0,145±0,003	0,190±0,004
II группа Физ. раствор	0,080±0,005	0,130±0,004	0,110±0,008
III группа Липоферол	0,090±0,003	0,140±0,006	0,070±0,009*

Примечание: статистическая достоверность к контролю с физ. раствором -  $p < 0.05$

Инфузия физиологического раствора способствовала некоторому снижению токсичности плазмы, но значения СММ не возвращались к исходным цифрам. Липоферол через 4 часа после введения достоверно снижал количество СММ в крови животных до исходных значений, что свидетельствует об его детоксицирующем действии.

Одним из важнейших показателей при изучении лечебной эффективности препарата является выживаемость животных. Было выявлено, что из 39 кроликов 1-ой группы все животные погибли в течение суток, во 2-ой группе – из 18 только 4 животных жили более суток. После введения липосомального препарата из 10 кроликов – 7 жили более суток, а 5 – более 3-х суток.

Таким образом, при изучении лечебной эффективности Липоферола в опытах на животных при экспериментальном ожоговом шоке показано, что липосомальный препарат с альфа-токоферолом повышает эффективность инфузионной терапии ожогового шока. Происходила коррекция системной гемодинамики (артериальное давление, ударный объем, сердечный выброс, общее периферическое сопротивление) и улучшение кислородного режима организма. Это способствовало восстановлению процессов тканевого дыхания, улучшению окислительного метаболизма, что свидетельствует об антигипоксическом действии препарата. Существенно снижались явления токсемии, активность процессов перекисидации, уменьшался протеолиз в крови обожженных животных. Так, применение Липоферола способствовало нормализации показателей метаболического ацидоза, процессов ПОЛ (уровень МДА, ДК, ШО) и показателей эндотоксемии (СММ). О повышении лечебной эффективности говорит и большая, по сравнению с контролем, выживаемость животных. Установлено, что препарат оказывал положительное действие в отношении большей части изученных показателей, характеризующих выраженность патологического процесса у экспериментальных животных.

### **Заключение**

Разработанный в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии препарат «Липоферол» представляет собой липосомальную эмульсию для внутривенных инфузий, состоящую из фосфолипидов сои и антиоксиданта – альфа-токоферола. Основная масса липосомальных частиц в препарате «Липоферол» находится в интервале от 60-80 нм. Известно, что размер липосомальных частицы менее 100 нм позволяют предохранить их от «захвата» РЭС, увеличить стабильность, время циркуляции в крови и обеспечить доставку лекарственного средства внутрь клетки. Чем меньше размер фосфолипидных наночастиц, тем более выражен их оптимизирующий эффект на фармакокинетику лекарства и эффективность его проникновения в органы и ткани. Препарат стерилен, апирогенен, срок годности препарата 2 года.



При изучении острой токсичности были получены данные, свидетельствующие о малой токсичности препарата и широком диапазоне между ЛД<sub>50</sub> и терапевтической дозой. Отсутствие острой и хронической токсичности Липоферола было подтверждено на 5-и видах животных. Изучение специфических видов токсичности Липоферола показало, что препарат не обладает алергизирующим действием и не угнетает активность иммунной системы организма.

По данным литературы фосфолипиды, входящие в состав препарата «Липоферол», не только являются строительным материалом для клеточных мембран, но и участвуют в процессах молекулярного транспорта, деления и дифференцировки клеток, регуляции активности различных ферментных систем, в частности, в функционировании регуляторных и рецепторных белков, связанных с формированием разнообразных фармакологических эффектов.

Выявленные в условиях изучаемых экспериментальных моделей фармакологические свойства Липоферола обусловлены не только свойствами фосфолипидов, но и прямым действием на клеточный метаболизм за счет входящего в состав препарата как антигипоксанта и антиоксиданта – альфа-токоферола, играющего роль универсального регулятора иммунных, окислительно-восстановительных процессов и процессов воспаления. Внутривенный способ введения липосомальной формы антиоксиданта позволяет полностью утилизироваться альфа-токоферолу даже в условиях нарушенного обмена (в частности белкового и желчных кислот), быстро доставлять его в клетки и восстанавливать их мембраны, улучшая функциональное состояние жизненно важных органов (сердца, мозга, печени, почек).

Липоферол, обладая дезинтоксикационными свойствами, комплексно воздействовал на различные звенья патологического синдрома, развившегося вследствие токсемии, метаболического ацидоза и эндогенной интоксикации. Препарат способствовал снижению активации свободно-радикальных процессов и степени эндотоксемии, а также нормализации биохимических показателей крови (АлАТ, АсАТ), являющихся неременным следствием острой интоксикации при токсическом гепатите, ожоговой болезни и синдроме сдавления.

При токсическом поражении любого генеза большое значение имеет выраженность воспалительного процесса, обусловленного воздействием ряда цитотоксических веществ: реактивных азотистых соединений, медиаторов воспаления, в том числе свободных окислительных радикалов [15]. Учитывая это, можно утверждать, что Липоферол, снижая

интенсивность процессов ПОЛ, участвуя в мембранных механизмах регуляции метаболизма, оказывает и противовоспалительное действие.

Введение Липоферола способствовало восстановлению соотношения фосфолипидных фракций эритроцитов и стабилизации мембран эритроцитов, уменьшению гемолиза. Липоферол оказывает умеренное антиагрегационное действие на тромбоциты.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют, что инфузии липосомального препарата с альфа-токоферолом «Липоферол» при различных критических состояниях (синдром длительного сдавления, токсический гепатит, ожоговый шок) приводят к снижению показателей процессов перекисного окисления липидов, улучшают системную гемодинамику, нормализуют функциональную активность жизненно важных органов, восстанавливают биохимические показатели крови, благоприятно влияют на реологические свойства крови и показатели гемостаза, снижают уровень интоксикации, повышают продолжительность жизни экспериментальных животных.

Препарат «Липоферол» обладает многофункциональными свойствами: мембраностабилизирующим, гепатопротективным, антиоксидантным, антигипоксантным и детоксицирующим действием и в силу этого способен повышать лечебную эффективность инфузионной терапии критических состояний, устраняя повреждающее действие различных токсических агентов и факторов.

На основании проведенных исследований была получена Рекомендация МЗ РФ на проведение клинических исследований препарата «Липоферол» у взрослых при таких критических состояниях как ожоговый шок, шокогенная травма, токсемии различного генеза, токсический гепатит.

## **Выводы**

1. Липоферол – липосомальный препарат для внутривенного введения представляет собой наносистему из фосфолипидов сои и антиоксиданта альфа-токоферола с размером частиц в интервале 60-80 нм.
2. Липоферол безвреден, нетоксичен, полностью метаболизируется и не вызывает аллергических реакций.
3. Липоферол обладает детоксицирующим, гепатопротективным, мембраностабилизирующим, антигипоксантным и антиоксидантным действиями.

## **Литература**

1. Лужников, Е.А. Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях / Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, А.М. Марупов. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008. – 200 с.
2. Медицинская токсикология: национальное руководство / под ред. Е.А. Лужникова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
3. Шанская А.И., Пучкова С.М., Недачина Н.А., Хмылова Г.А. Исследование фракционного состава фосфолипидных компонентов липосомального препарата Липоферол с применением усовершенствованного метода тонкослойной хроматографии // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2015. – Т. 15. – Ст. 57. – С. 718-730. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom15/art57.html>
4. Лекарственные препараты в России: справочник /М.: АстраФармСервис. – 2005. – 1536 с.
5. Справочник лекарственных препаратов Видаль. Описание лекарственных средств. – <http://www.vidal.ru>.
6. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 года №1045-73.
7. Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». – М., 1977. – 17 с.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд. – М.: Медицина. 2005. – С. 832.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /под общ. редакцией Р. У. Хабриева, И. А. Денисова, В. Б. Герасимова, В. Г. Кукеса. — М.: 2005. — 359 с.
10. Кочетыгов Н.И., Ремизова М.И., Макеев А.Б., Шанская А.И. и др. Изучение лечебной эффективности липосом при ожоговом шоке в эксперименте // Вестник службы крови России.- 1999. – №2. – С. 45-49.
11. Малахова, М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации / М.Я.Малахова // Эфферентная терапия. – 1995. – Т. 1, № 1. – С. 61–63.
12. Сокольская В.А. Влияние антиоксидантов на энзиматические показатели миокарда при тяжелых ожогах в эксперименте // Ожоговая болезнь. – Киев. – 1984. – С. 115-116.

13. Руководство по общей и клинической трансфузиологии /под редакцией Ю.Л. Шевченко, В.Н. Шабалин, М.Ф.Заривчацкий, Е.А.Селиванов. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2003. – 608 с.
14. Трансфузиология: Клиническое руководство /под редакцией М.Ф. Заривчацкого. – Пермь: 2014. – 900 с.
15. Козлов, В.К. Сепсис. Этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии / В.К.Козлов. – Киев: АННА-Т, 2007. – 296 с.