

Г. С. Фесюнова^{1,2}, В. В. Віт¹, Н. І. Молчанюк¹,
О. П. Сотнікова^{1,2}, Г. С. Григор'єва³

Експериментальна верифікація безпечності періокулярних способів застосування ліпосомальної форми кверцетину в офтальмології

¹Державна установа «Інститут очних хвороб і тканинної терапії
імені В. П. Філатова Національної академії медичних наук України», м. Одеса

²Товариство з обмеженою відповідальністю «Наномедтех», м. Київ

³Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: ліпосомальна форма
кверцетину, періокулярний спосіб
уведення, гістологія, ультраструктура

Одним з перспективних напрямів оптимізації ефектів та таргетності дії лікарського засобу є розширення переліку способів його клінічного застосування. Стосовно офтальмології це передбачає цілеспрямований пошук препаратів, для яких можливе поєднання традиційних інстиляцій з періокулярним введенням. Така схема може бути особливо ефективною за використання ліпосом, амбівалентність будови яких апріорі створює умови для проникнення лікарського засобу до різних структур ураженого ока. Важливою передумовою реалізації такого підходу є встановлення безпечності періокулярного застосування, яке для ліпосомальних офтальмологічних препаратів досі взагалі не вивчали.

Відомий лікарський засіб Ліпофлавіон, очні краплі, що містить кверцетин у фосфатидилхолінових ліпосомах, є ефективною системою транспорту біофлавоноїда (drug delivery system). Кверцетин має виключно високу антиоксидантну активність, інгібує синтез прозапальних лейкотрієнів, зменшує патологічно підвищену судинно-тканинну проникненість і нормалізує трофіку тканин. Фосфатидилхолін виявляє антиоксидантні, антигіпоксичні та мембраностабілізуючі властивості. Ліпосомальна будова Ліпофлавіону при

інстиляціях забезпечує офтальмодоступність кверцетину, субстанції якого притаманна вкрай низька розчинність і біодоступність.

Ліпофлавіон застосовують як проти-запальний засіб, стимулятор регенерації пошкоджених тканин ока, імунокоректор і антиоксидант у хворих з травматичними ураженнями рогівки, кератитами різного генезу, при запальних захворюваннях переднього відділу ока, дегенеративних змінах сітківки та зорового нерва, у комплексному лікуванні діабетичної ретинопатії [1–5]. Позитивні результати численних експериментальних і клінічних досліджень інстиляцій Ліпофлавіону свідчать про актуальність обґрунтування інших способів його введення та розширення показів до його клінічного використання.

Мета дослідження – визначення впливу періокулярного введення препарату «Ліпофлавіон» на зовнішні та внутрішні структури ока та встановлення можливих небажаних наслідків з використанням показових гістологічних та електронно-мікроскопічних методів досліджень.

Матеріали та методи. У дослідженні використано зразки дослідно-промислової серії Ліпофлавіону (ТОВ «НаноМедТех») наступного складу: фосфатидилхолін – 27,5 мг, кверцетин – 0,75 мг (флакон 1); ліофілізований порошок: ліпосоми з розміром (116 ± 5) нм (96,6 %); розчинник – натрія хлориду розчин 0,9 % (флакон 2). Зазначені

зразки за показниками МКЯ є фармацевтично еквівалентними ліцензованою в Україні препаратом «Ліпофлавоно, очні краплі».

Дослідження проведені на шести (12 очей) статевозрілих здорових кроляч породи Шиншила обох статей масою 2,2–3,0 кг, віком 6–7 місяців, вирощених у віварії ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України». Тварин утримували в індивідуальних клітках за температури 20–25 °С, вологості – не більше 50 %, природного світлового режиму «день-ніч», на стандартному харчовому раціоні. Поводження з тваринами відповідало правилам «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» [6].

Періокулярне введення Ліпофлавоно (субкон'юнктивальний та парабульбарний спосіб) проводили в стерильних умовах з використанням анестетику алкаїну. При кожному способі застосування кролям одноразово вводили 1 мл емульсії, утвореної після поєднання ліофілізованого препарату з розчинником та струшування протягом 1 хв. Зразки тканин ока забирали через 2 доби після введення препарату. Евтаназію тварин здійснювали методом повітряної емболії відповідно до «Вимог біоетики Гельсінської декларації про етичне регулювання медичних досліджень» [7].

Вивчення структурних змін кон'юнктиви, рогівки, сітківки та увеального тракту проводили після енуклеації очей експериментальних тварин та

фіксації в 10 % нейтральному формаліні з наступною заливкою в парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном і еозинном [8].

Ультраструктурні дослідження кон'юнктиви, рогівки, склери, сітківки, судинної оболонки й зорового нерва кроля проводили після фіксації тканини в 2,5 % розчині глутаральдегіду в фосфатному буфері (рН 7,4) з наступною дофіксацією 1 % розчином осмієвої кислоти в тому самому буферному розчині. Далі зразки зневоднювали в спиртах висхідної міцності та просочували матеріал у суміші смол Епо-наралдит. Ультратонкі зрізи контрастували розчинами уранілацетату та цитрату свинцю за E. S. Reynoldes [9]. Перегляд і фотографування зрізів здійснювали на електронному мікроскопі ПЕМ-100-01. Усього отримано та проаналізовано 72 електронних мікрофотографії.

Результати та їх обговорення. При макроскопічному обстеженні ока та повік не виявлено наслідків субкон'юнктивального чи/та парабульбарного введення препарату (почервоніння, крововиливи, подразнення тощо).

Світлооптичні зміни кон'юнктиви і рогівки після субкон'юнктивального введення Ліпофлавоно. Кон'юнктива експериментальних тварин має звичайну будову. Епітелій кон'юнктиви складається з трьох або чотирьох шарів епітеліоцитів; плоский, не ороговіючий. В області лімба епітелій багат шаровий з переважанням дрібних клітин циліндричної або кубічної форми з невеликим обідком цитоплазми та гіперхромними ядрами (рис. 1).

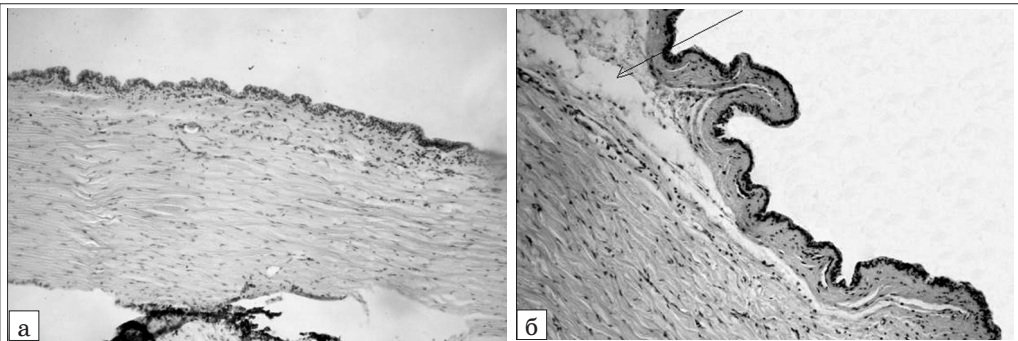


Рис. 1 а, б. Бульбарна кон'юнктива (а) і кон'юнктива в області лімба (б) без виражених структурних змін. Відзначається незначний набряк субепітеліальної сполучної тканини (стрілка). Збільш. $\times 40, 120$. Забарвлення гематоксилін-еозинном

У кон'юнктиві визначаються також бокалоподібні клітини. В області лімба кон'юнктива складається приблизно з 10 шарів епітеліальних клітин. У підслизовій сполучній тканині визначаються кровоносні судини, навколо яких є скупчення лімфоцитів і меланоцитів (рис. 2).

Наявний незначний набряк строми, але відсутні будь-які виражені патологічні зміни кон'юнктиви.

Патологічні зміни не встановлено й у роговій оболонці. Відзначається тільки незначний набряк поверхневих клітин і строми. Структурні зміни строми та заднього епітелію (ендотелію) відсутні (рис. 3).

Таким чином, субкон'юнктивальне введення препарату не впливає на структуру кон'юнктиви та рогової оболонки.

Світлооптичні зміни сітківки та увеального тракту після парабульбарного введення Ліпофлакону. При парабульбарному введенні препарату виявлено незначний набряк шару гангліозних клітин сітківки (рис. 4). Будь-яких структурних змін інших шарів сітківки, а також увеального тракту і пігментного епітелію не виявлено.

Відсутні ознаки запалення. В одному спостереженні в ретробульбарних тканинах проявляється гомогенна слабо базofilна однорідна речовина, що, скоріше за все, є залишком ліпідної матриці введеного препарату (рис. 5).

Таким чином, парабульбарне введення Ліпофлакону не спричиняє суттєвих структурних змін судинної оболонки та сітківки.

Ультроструктурні зміни кон'юнктиви після субкон'юнктивального введення Ліпофлакону. Епітеліальний покрив кон'юнктиви складається з клітин з чіткою ультроструктурною організацією. Поверхневі та середні шари епітелію кон'юнктиви містять клітини з округлими ядрами. Цитоплазма багата на органели: мітохондрії, рибосоми, полісоми, а також мікрофібрили (рис. 6).

Клітини базального епітелію відрізняються великими ядрами з грудочками хроматину або периферичним гіперхроматозом і містять великі ядерця. У цитоплазмі клітин рясна кількість вільних рибосом, полісом, мітохондрій та інших органел (рис. 7).

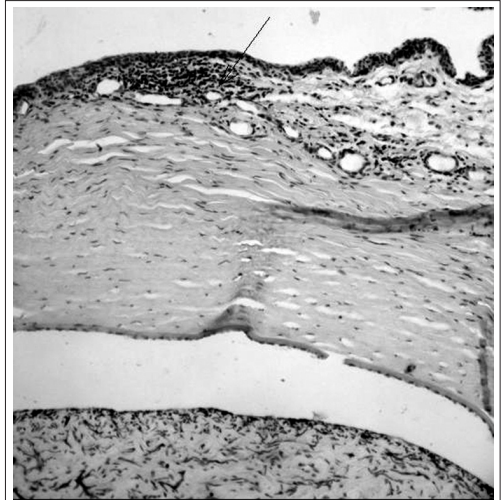


Рис. 2. Кон'юнктива в області лімба. Відзначається формування периваскулярних лімфоїдних муфт (стрілка). Збільш. $\times 70$. Забарвлення гематоксилін-еозином

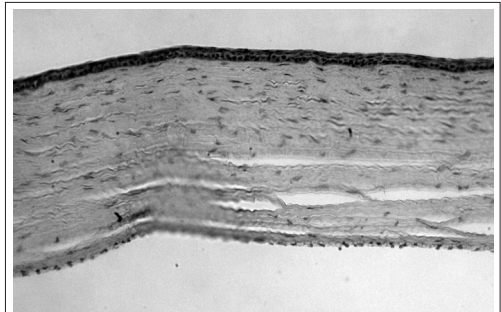


Рис. 3. Рогова оболонка. Патологічні зміни відсутні. Збільш. $\times 40$. Забарвлення гематоксилін-еозином

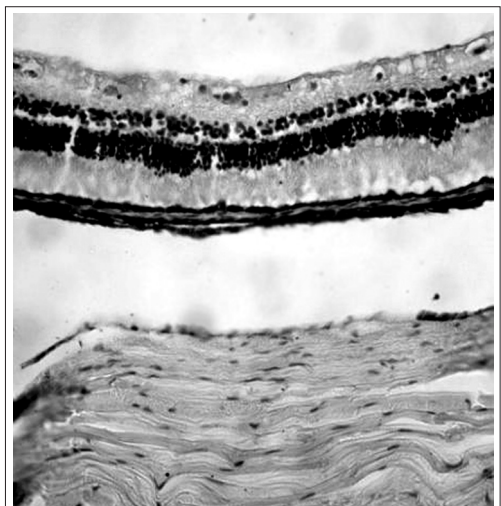


Рис. 4. Сітківка. Відзначається наявність незначного набряку шару нервових волокон і гангліозних клітин. Збільш. $\times 40, 180$. Забарвлення гематоксилін-еозином



Рис. 5. Скупчення однорідного слабо базофільного матеріалу в м'яких тканинах орбіти поблизу очного яблука. Збільш. $\times 40$. Забарвлення гематоксилін-еозином

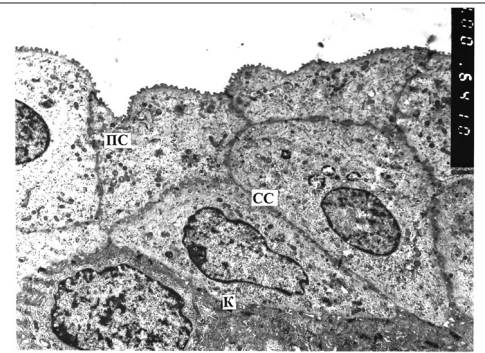


Рис. 6. Ультраструктура кон'юнктиви після субкон'юнктивального введення Ліпофлавоу. Поверхній та середні шари переднього епітелію без структурних змін. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 15\ 000$

Примітка. К – кон'юнктива, ПС – поверхній шари переднього епітелію рогівки, СС – середні шари переднього епітелію рогівки.

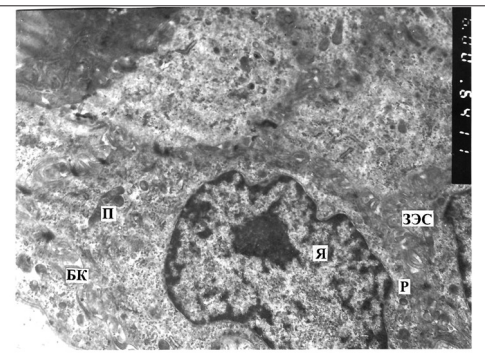


Рис. 7. Ультраструктура кон'юнктиви після субкон'юнктивального введення Ліпофлавоу. Клітина базального епітелію з великим ядром і рясною цитоплазмою, що містить велику кількість органел. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 6000$

Примітка. БК – базальна клітина, Я – ядро, Р – рибосоми, ЗЭС – зерниста ендоплазматична сітка, П – полісоми.

Субепітеліальна тканина відрізняється ознаками невеликого міжклітинного набряку, розпушена (рис. 8). Вона містить сполучнотканинні клітини звичайної структури та невеликі пучки колагенових фібрил, розташованих у різних напрямках. Частина фіброblastів відрізняється підвищеним вмістом органел у цитоплазмі клітини (рис. 9).

Наведений опис свідчить про те, що Ліпофлавоу практично не модифікує тканину кон'юнктиви. Однак слід зазначити, що в клітинах базального епітелію частина фіброblastів субепітеліальної області має ознаки підвищеної активності, про що свідчить

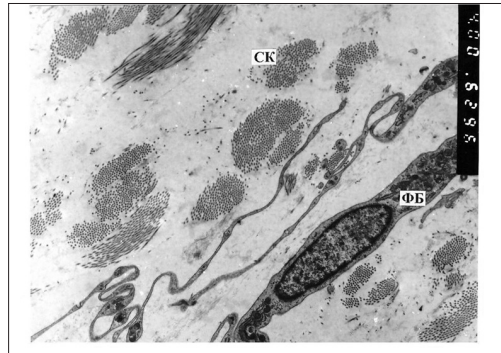


Рис. 8. Ультраструктура кон'юнктиви після субкон'юнктивального введення Ліпофлавоу. Загальний вигляд строми субепітеліального відділу. Невеликі ознаки міжклітинного набряку. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 4000$

Примітка. СК – строма кон'юнктиви, ФБ – фіброblast.

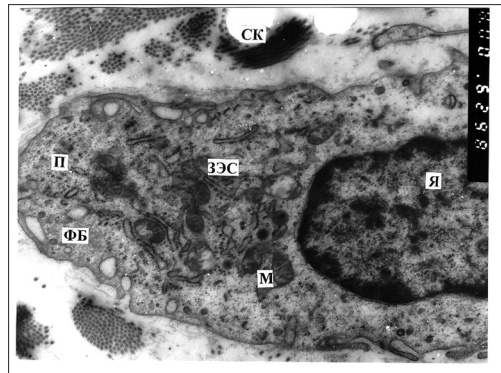


Рис. 9. Ультраструктура кон'юнктиви після субкон'юнктивального введення Ліпофлавоу. Фрагмент фіброblastа з великою кількістю різноманітних органел у цитоплазмі. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 8000$

Примітка. СК – строма кон'юнктиви, ФБ – фіброblast, Я – ядро, М – мітохондрія, ЗЭС – зерниста ендоплазматична сітка, П – полісома.

порівняно великий вміст у них органел як білоксинтезуючих і енергоутворюючих систем.

Ультраструктурні зміни рогівки після субкон'юнктивального введення Ліпофлакону. Передній епітелій рогівки при електронно-мікроскопічному дослідженні має чітку ультраструктурну організацію. Базальні клітини великі зі специфічними утвореннями, полудесмосомами, і базальною мембраною (рис. 10). Строма рогівки складається з типових колагенових ламел і сплосчених кератоцитів з довгими відростками (рис. 11). Десцетова мембрана звичайного вигляду. Задній епітелій складається з одного ряду клітин, зі сплосченими ядрами та великою кількістю типових цитоплазматичних органел (рис. 12).

Таким чином, за результатами електронно-мікроскопічного дослідження субкон'юнктивальне введення Ліпофлакону не призводить до змін ультраструктури рогівки.

Ультраструктурні зміни судинної оболонки, сітківки та склери після парабульбарного введення Ліпофлакону. Сполучнотканинна основа судинної оболонки містить ознаки набряку. Пучки колагенових фібрил роз'єднані, колагенові фібрили розпушені, ендотелій стінки хоріокапілярів дуже тонкий. Частина ендотеліальних клітин хоріокапілярів у нормальному стані. Окремі клітини різко набрякли. У хоріокапілярах не виражена фенестрація ендотеліальних клітин. Міжклітинний набряк також спостерігається в тканинах мембрани Бруха. Базальна складчастість пігментного епітелію сітківки виражена, проте її елементи відрізняються розширеннями різноманітної форми з електронно-прозорим вмістом. У цитоплазмі клітин також підвищена кількість везикул і вакуолів з електронно-прозорим вмістом. Спостерігається розпушення стромы судинної оболонки, витончення ендотеліальної вистилки хоріокапілярів, дезорганізація мембрани Бруха та гідропічні зміни в цитоплазмі пігментного епітелію. Апікальна область клітин і зовнішніх сегментів фоторецепторів клітин без змін (рис. 13).

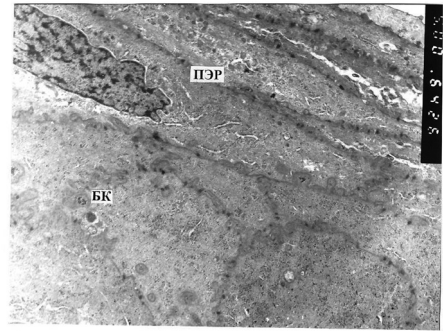


Рис. 10. Ультраструктура рогівки після субкон'юнктивального введення Ліпофлакону. Передній епітелій рогівки з великими базальними клітинами та не зміненою структурою. Електронна мікрофотографія. Збільш. × 5000

Примітка. ПЭР – передній епітелій рогівки, БК – базальна клітина.

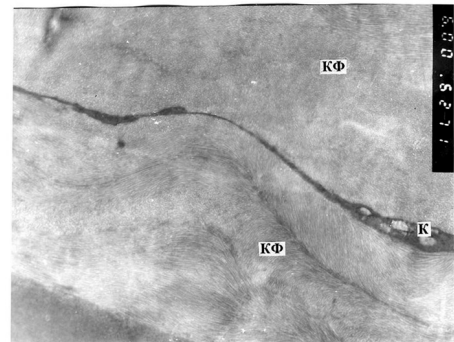


Рис. 11. Ультраструктура рогівки після субкон'юнктивального введення Ліпофлакону. Колагенові волокна стромы рогівки з кератоцитами. Їхня структура практично не змінена. Електронна мікрофотографія. Збільш. × 6000

Примітка. К – кератоцит, КФ – колагенові фібрили.

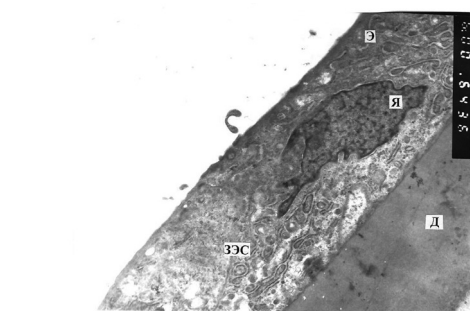


Рис. 12. Ультраструктура рогівки після субкон'юнктивального введення Ліпофлакону. Клітина ендотелію зі звичайною ультраструктурою. Електронна мікрофотографія. Збільш. × 6000

Примітка. Д – десцетова оболонка, Э – ендотелій, Я – ядро, ЗЭС – зерниста ендоплазматична сітка.

Разом з тим, на інших ділянках зрізу описані зміни значно менш виражені. Стан структур хоріокапілярів і клітин пігментного епітелію практично не відрізняється від норми. Гідропічні зміни, в основному, присутні на окремих ділянках цитоплазми клітин пігментного епітелію сітківки. Апікальна область без змін (рис. 14). Структура пігментного епітелію сітківки, у цілому, зберігається, включаючи базальну складчастість. Фоторецепторні клітини мають нормальну ультраструктуру, як й інші відділи сітківки. Ядерна частина фоторецепторних клітин без змін (рис. 15). Гангліозна клітина з невеликим набуханням мітохондрій у цитоплазмі (рис. 16).

Після парабульбарного введення Ліпофлаону клітинні елементи й сполучнотканинні волокна практично без особливостей (рис. 17).

Таким чином, на підставі узагальнених гістоморфологічних даних щодо наслідків субкон'юнктивального та парабульбарного введення Ліпофлаону можна зробити висновок про відсутність негативного впливу на структури кон'юнктиви та рогової оболонки, а також суттєвих структурних змін судинної оболонки та сітківки.

При електронно-мікроскопічному дослідженні встановлено, що після субкон'юнктивального введення Ліпофла-

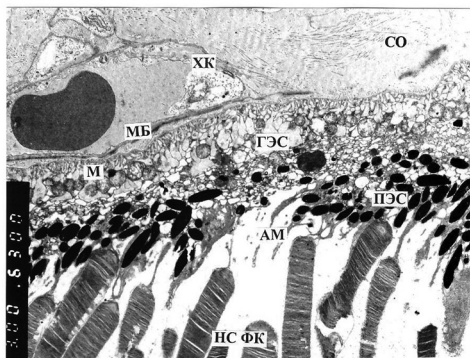


Рис. 13. Ультраструктура хоріокапілярів і сітківки після парабульбарного введення Ліпофлаону. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 3000$

Примітка. СО – судинна оболонка, ХК – хоріокапіляри, МБ – мембрана Бруха, ПЭС – пігментний епітелій сітківки, ГЭС – гладка ендоплазматична сітка, М – мітохондрії, АМ – апікальні мікровілли, НСФК – зовнішні сегменти фоторецепторних клітин.

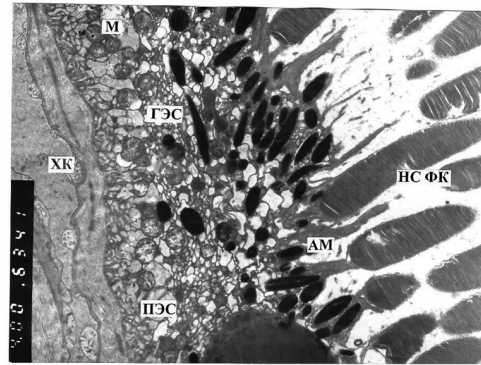


Рис. 14. Ультраструктура хоріокапілярів і сітківки після парабульбарного введення Ліпофлаону. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 4000$

Примітка. ХК – хоріокапіляри, ПЭС – пігментний епітелій сітківки, М – мітохондрії, ГЭС – гладка ендоплазматична сітка, АМ – апікальні мікровілли, НСФК – зовнішні сегменти фоторецепторних клітин.

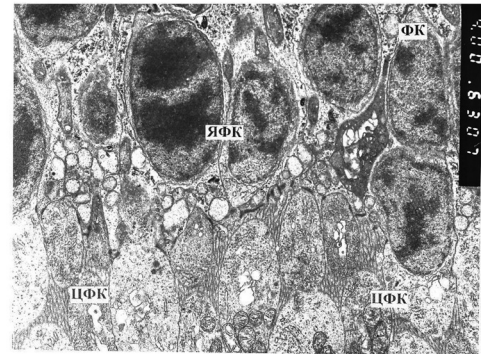


Рис. 15. Ультраструктура сітківки після парабульбарного введення Ліпофлаону. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 4000$

Примітка. ФК – фоторецепторні клітини, ЯФК – ядра фоторецепторних клітин, ЦФК – цитоплазма фоторецепторних клітин.

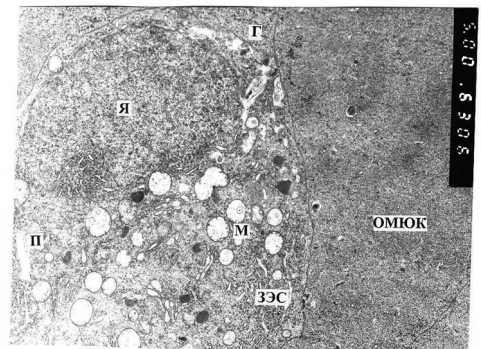
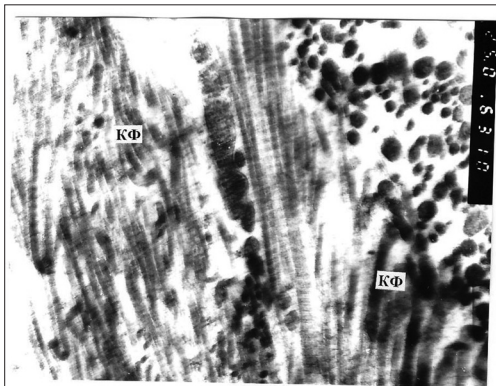


Рис. 16. Ультраструктура сітківки після парабульбарного введення Ліпофлаону. Електронна мікрофотографія. Збільш. $\times 5000$

Примітка. Г – гангліозна клітина, ЗЭС – зерниста ендоплазматична сітка, М – мітохондрії, Я – ядро, П – полісоми, ОМЮК – відростки моллеровських клітин.



*Рис. 17. Ультраструктура склери після парабальбарного введення Ліпофлавоу. Нормальна ультраструктура колагенових фібрил склери. Електронна мікрофотографія. Збільш. × 25000
Примітка. КФ – колагенові фібрили склери.*

вону зберігається нормальна організація структур заднього епітелію та задніх шарів строми рогівки, а також ультраструктури кон'юнктиви. Стан клітин переднього епітелію дещо змінений через набряк органел частини базальних клітин. Незначний набряк також спостерігається в сполучнотканинних суб'епітеліальних структурах строми рогівки.

При парабальбарному введенні в судинній оболонці є окремі прояви

міжклітинного набряку строми. У хоріокапілярах у деяких клітинах виявляються просвітлення цитоплазми та елементи набряку внутрішньоклітинних структур, але переважна частина ендотеліальних клітин хоріокапілярів знаходиться в нормальному стані. Сітківка зберігає свою нормальну організацію й ультраструктуру. Місцями в шарах сітківки відмічаються клітини з проявами набряку внутрішньоклітинних органел, що переважно стосується пігментного епітелію сітківки.

Висновок

Отримані результати свідчать про відсутність небажаних очних проявів за різних обраних способів періокулярного введення Ліпофлавоу, причому субкон'юнктивальне введення є практично нешкідливим щодо структури та ультраструктури кон'юнктиви, рогової оболонки та сітківки, а незначні зміни за парабальбарного введення не розглядаються як серйозні.

Верифікація періокулярних способів уведення Ліпофлавоу створює перспективу розширення шляхів застосування ліпосомального засобу при очних патологіях для цілеспрямованої доставки препарату до осередку ураження.

1. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Харьков : Издательский центр НТУ «ХПИ», 2011. – № 1. – С. 219–221.
2. Пасечникова Н. В. Клинико-биохимическое обоснование применения препарата «Липофлавон» у больных возрастной катарактой после операции экстракции катаракты и имплантации продуктов перекисного окисления / Н. В. Пасечникова, Р. А. Горшкова // Украинский мед. альманах. – 2006. – Т. 9, № 1. – С. 214–218.
3. Пасечникова Н. В. Экспериментальное обоснование применения Липофлавоу для снижения степени послеоперационной воспалительной реакции / Пасечникова Н. В., Горшкова Р. А. // Офтальмол. журн. – 2006. – № 2. – С. 36–40.
4. Петруня А. М. Эффект применения глазных капель и инъекционной формы препарата Липофлавон у больных непролиферативной диабетической ретинопатией / А. М. Петруня, А. В. Спектор. – Офтальмологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 36–39.
5. Иванова Н. В. Значение провоспалительных факторов в прогрессировании диабетической ретинопатии, патогенетическое обоснование и эффективность их коррекции / Иванова Н. В., Ярошева Н. А. // Новости медицины и фармации. – № 9 (325). – 2010.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 53 p.
7. Norman H. J. Requirements of bioethics of Helsinki declaration about ethical regulation of medical researches / H. J. Norman // Хроніка ВООЗ. – 1985. – Т. 39, № 3. – С. 3–9.
8. Матвієнко А. В. Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів / Матвієнко А. В., Степанова Л. В. // Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; Під ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – С. 196–208.
9. Reynoldes E. S. The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain in electron microscopy / Reynoldes E. S. // J. of Cell Biol. – 1963. – V. 17. – P. 208–212.

Г. С. Фесюнова, В. В. Віт, Н. І. Молчанюк, О. П. Сотнікова, Г. С. Григор'єва
Експериментальна верифікація безпечності періокулярних способів
застосування ліпосомальної форми кверцетину в офтальмології

Мета дослідження – визначення впливу періокулярного введення ліпосомального препарату «Ліпофлавіон» на зовнішні та внутрішні структури ока та встановлення можливих небажаних наслідків з використанням показових гістологічних та електронно-мікроскопічних експериментальних методів.

Отримані результати свідчать про відсутність небажаних очних проявів за різних обраних способів періокулярного введення Ліпофлавіону, причому субкон'юнктивальне введення є практично нешкідливим щодо структури та ультраструктури кон'юнктиви, рогової оболонки та сітківки при мінімальних змінах за парабульбарного введення.

Верифікація періокулярних способів введення Ліпофлавіону створює перспективу розширення шляхів застосування ліпосомального засобу при очних патологіях для цілеспрямованої доставки препарату до осередку ураження.

Ключові слова: ліпосомальна форма кверцетину, періокулярні шляхи введення, гістологія, ультраструктура

Г. С. Фесюнова, В. В. Вит, Н. И. Молчанюк, Е. П. Сотникова, А. С. Григорьева
Экспериментальная верификация безопасности периокулярных способов
применения липосомальной формы кверцетина в офтальмологии

Цель исследования – определение влияния периокулярного введения липосомального препарата «Липофлавион» на внешние и внутренние структуры глаза и установление возможных нежелательных последствий с использованием показательных гистологических и электронно-микроскопических экспериментальных методов.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии нежелательных глазных проявлений при разных выбранных способах периокулярного введения Липофлавиона, причем субконъюнктивальное введение практически безопасно для структуры и ультраструктуры конъюнктивы, роговой оболочки и сетчатки, а изменения при парабульбарном введении минимальны.

Верификация периокулярных способов введения Липофлавиона создает перспективу расширения путей применения липосомального средства при глазных патологиях для целенаправленной доставки препарата в очаг поражения.

Ключевые слова: липосомальная форма кверцетина, периокулярные пути введения, гистология, ультраструктура

G. S. Fesiunova, V. V. Vit, N. I. Molchaniuk, O. P. Sotnikova, G. S. Grigoryeva
Experimental verification of the safety of periocular application of quercetin
liposomal form in ophthalmology

The aim of the study is to determine the impact of periocular application of liposomal drug «Lipoflavon» on the external and internal structures of the eye and to establish the possible adverse effects using the representative histological and electron-microscopic experimental methods.

The results indicate the absence of adverse ocular manifestations in different chosen ways of periocular Lipoflavon injections: subconjunctival administration is practically safe for the structure and the ultrastructure of conjunctiva, cornea and retina, with minimal changes under parabolbarian administration.

The verification of periocular Lipoflavon injections creates the prospect of expanding the ways of liposomal agent application in ocular pathologies for targeted delivery of the drug to the lesion focus.

Key words: quercetin liposomal form, periocular administration, histology, ultrastructure

Надійшла: 21 січня 2016 р.

Контактна особа: Фесюнова Г. С., ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В. П. Філатова НАМН України», буд. 49/51, Французький бульвар, 65061, м. Одеса.
Тел.: + 38 0 48 729 83 48.