

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 544.77:577.115+57.084.1

Поступило в редакцию 05.09.2016

Received 05.09.2016

**Е. И. Дубатовка¹, академик В. Е. Агабеков¹, И. Л. Лутик²,
О. Н. Яцевич², И. Э. Адзерихо²**

¹*Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь*

**ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ СТРЕПТОКИНАЗЫ
НА ОБРАЗОВАНИЕ Д-ДИМЕРОВ**

Получены липосомы со стрептокиназой с размерами ~60 нм, представляющие собой смесь, состоящую из свободного (66,3 %) и связанного (23,7 %) препарата. На основании анализа кинетики образования Д-димеров в плазме крови собак установлено, что липосомальная форма стрептокиназы обладает пролонгированным эффектом в течение 180 мин.

Ключевые слова: липосомы, везикулы, лиофилизация, стрептокиназа, Д-димеры, фибринолиз.

K. I. Dubatouka¹, Academician V. E. Agabekov¹, I. L. Lutsik², V. N. Yatsevich², I. E. Adzerikho²

¹*Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus*

EFFECT OF LIPOSOMAL STREPTOKINASE ON THE D-DIMERS FORMATION

Liposomal streptokinase (a mixture of free (66.3 %) and entrapped (23.7 %) drug) with a diameter of ~60 nm was prepared. The analysis of the D-dimers formation kinetics in the dog's blood plasma showed that the liposomal streptokinase had a prolonged effect up to 180 minutes.

Keywords: liposomes, vesicles, lyophilization, streptokinase, D-dimers, fibrinolysis.

Введение. Липосомы представляют собой замкнутые сферические частицы (везикулы), содержание которых ограничено числом липидов, сходным по строению и свойствам с биологической мембраной [1; 2]. Для практического применения важна их способность включать в себя и удерживать вещества различной природы. Введение биологически активных веществ в везикулы может значительно повысить их терапевтическую эффективность, поскольку действующее вещество, находящееся внутри, защищено мембраной от действия неблагоприятных факторов, и в то же время не позволяет токсичному соединению превысить допустимую концентрацию в биологических жидкостях организма. Липосома в данном случае выполняет роль контейнера, из которого препарат высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени [3]. Актуальной задачей является определение размера, заряда липосом, степени включения, поскольку они оказывают влияние на свойства препарата, его биодоступность и активность.

Одним из перспективных направлений повышения медикаментозного тромболитического эффекта является использование липосом, нагруженных тромболитическим препаратом [4]. В исследованиях *in vivo* установлено, что внутривенное введение липосомальной формы стрептокиназы (СТК) в остром эксперименте у собак приводит к достоверному превышению степени свободного просвета тромбированной артерии в сравнении с традиционной лекарственной формой препарата (инъекционным раствором) через 2 ч наблюдения [5]. При этом морфометрический анализ по-

зволил оценить конечные результаты эффективности тромболиза без дифференцированного анализа вклада фибринолитического компонента в общую тромболитическую активность препарата. Динамика уровня Д-димера (специфического продукта расщепления поперечно-сшитого фибрина) в крови отражает процесс образования и разрушения уже имеющегося тромба [6]. Предполагается, что увеличение уровня Д-димера можно использовать для определения эффективности проведенного тромболиза [7]. В связи с этим изучение динамики фибринолиза тромбированной артерии при использовании липосомальной формы СТК путем оценки изменения во времени концентрации Д-димеров плазмы крови весьма актуально.

Цель работы – получить липосомальную форму стрептокиназы и изучить ее влияние на кинетику образования Д-димеров *in vivo*.

Материалы и методы исследования. В работе использовали препарат «Стрептокиназа» (Белмедпрепараты, Беларусь) в виде лиофилизированного порошка с активностью 750000 МЕ (лекарственная форма). Липосомы (Лип) получали методом гидратации липидной пленки [2]. Смесь яичного фосфатидилхолина (Sigma), холестерина (Acros Organics) и гексадециламина (Sigma) в хлороформе в мольном соотношении 2 : 1 : 0,1 упаривали на водяной бане (37 °С), используя роторный испаритель ИР-1М (РФ) до образования тонкой пленки липидов на стенках колбы с последующим досушиванием в течение 1 ч под вакуумом до полного удаления растворителя. Затем пленку гидратировали 40 мМ раствором глюкозы (х. ч.) на ультразвуковой ванне BANDELIN Sonorex (Германия) с частотой 35 кГц и полученный золь высушивали в лиофильной сушке FreeZone (Labcongo, США). После этого добавляли стрептокиназу из расчета 4200 ЕД/кг веса собаки, перемешивали, проводили 3 цикла замораживания–оттаивания (от –20 °С до +37 °С) и лиофилизировали.

Гидродинамический диаметр липосом определяли методом динамического рассеяния света, дзета-потенциал измеряли по их электрофоретической подвижности на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Форму и размеры липосом устанавливали также просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ), используя JEM-100CX (Япония).

Содержание стрептокиназы в липосомах контролировали методом Бредфорда путем окрашивания белков при помощи Кумасси G-250 [8]. Концентрацию свободной СТК определяли в супернатанте после центрифугирования липосом при 15 тыс. об/мин, +4 °С в течение 30 мин на центрифуге Allegra 64R (Beckman Coulter, США).

Эксперименты *in vivo* проводили на 10 наркотизированных и зафиксированных беспородных самцах собак массой 12–13 кг с моделированным двухчасовым артериальным тромбозом в соответствии с «Правилами доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Животные были разделены на 2 группы (по 5 в каждой группе) в соответствии с вводимым препаратом. 1-й группе вводили липосомальную форму стрептокиназы, 2-й группе – лекарственную форму (инъекционный раствор) препарата. Инъекции препаратов в дозе 4200 ЕД/кг веса животного проводили в бедренную вену однократно в течение 1–2 мин в объеме 1 мл. Дополнительно проводили болюсное введение в зону тромба гепарина из расчета 50 ЕД/кг с последующей инфузией препарата в дозе 22 ЕД/(кг · ч) до момента окончания исследования. В качестве контроля использовали тромбированную артерию без введения препаратов. Наблюдение за животными и взятие крови проводилось в следующие временные интервалы: исходно, после формирования тромба, через 15, 30, 45, 60, 90, 120 и 180 мин после введения препаратов. Кровь для анализа забирали из бедренной вены с использованием шприц-пробирок Monovette, содержащих стандартное количество цитрата натрия. Определение концентрации Д-димеров проводили в цитратной плазме турбидиметрическим методом с использованием латексных частиц с иммобилизованными на их поверхности антителами против Д-димеров при помощи анализатора Hitachi 912 и реактивов PZ CORMAY S.A. (Польша).

Результаты и их обсуждение. В качестве контейнеров для водорастворимых препаратов чаще всего используются моноламеллярные липосомы, которые характеризуются наибольшей величиной соотношения внутреннего объема к поверхности. Липосомальную форму стрептокиназы Лип(СТК) получали гидратацией липидной пленки водным раствором глюкозы под действием ультразвука с последующей лиофилизацией и регидратацией раствором препарата. Полученные липосомы повторно лиофилизировали. Применение ультразвука позволило получить моноламел-

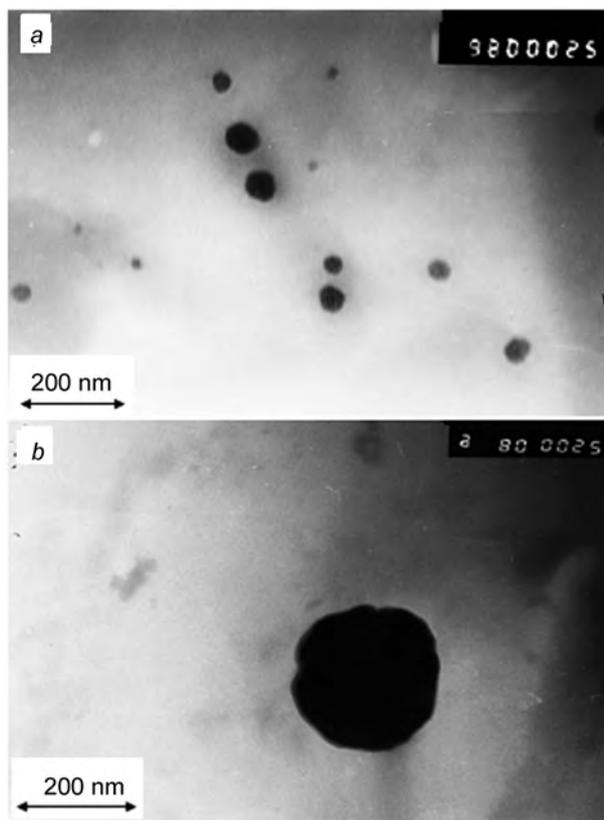


Рис. 1. ПЭМ изображения липосом (а, увеличение 72 тыс.) и липосомальной формы стрептокиназы (b, увеличение 80 тыс.)

Fig. 1. Transmission electron microscopy images of liposomes (a, $\times 72,000$ magnification) and the liposomal form of streptokinase (b, $\times 80,000$ magnification)

хранения при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение суток, 6 и 34 недель показал, что значения гидродинамического диаметра и дзета-потенциала за весь период наблюдения практически не изменяются (таблица). Это указывает на возможность длительного хранения липосом со стрептокиназой (34 недели).

Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал лиофилизированных липосом со стрептокиназой при их хранении (температура $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Hydrodynamic diameter and the zeta potential of streptokinase-liophilized liposomes during their storage

Хранение после лиофилизации Storage after liophilization	Гидродинамический диаметр, нм Hydrodynamic diameter, nm	Дзета-потенциал, мВ Zeta potential, mV
1 сутки 1 day	$56,8 \pm 11,0$	$-18,2 \pm 0,8$
6 недель 6 weeks	$61,2 \pm 9,0$	$-19,7 \pm 2,0$
34 недели 34 weeks	$54,5 \pm 15,0$	$-21,8 \pm 0,7$

Методом Бредфорда установлено, что Лип(СТК) представляет собой смесь, состоящую из свободной (66,3 %) и связанной с липосомами (23,7 %) стрептокиназы. Благодаря этому становится возможным пролонгирование действия Лип(СТК) не только за счет медленного высвобождения препарата из липосом, но и проявления тромболитического эффекта свободной стрептокиназой на ранних стадиях.

Введение инъекционного раствора стрептокиназы и Лип(СТК) экспериментальным животным способствует фибринолизу, о чем свидетельствует увеличение концентрации Д-димеров

лярные липосомы (Лип) с размерами $21,0 \pm 5,0$ нм и дзета-потенциалом $32,4 \pm 2,0$ мВ, а глюкоза была использована в качестве криопротектора для предотвращения их слияния и укрупнения при замораживании и сушке. Лиофилизация и повторная гидратация приводят к незначительному увеличению размеров до $26,0 \pm 7,0$ нм и уменьшению значения дзета-потенциала до $26,6 \pm 1,0$ мВ.

После добавления стрептокиназы к лиофилизированным липосомам, проведения 3 циклов замораживания–оттаивания и повторной сушки размер полученных Лип(СТК) составляет $56,8 \pm 11,0$ нм, а значение дзета-потенциала уменьшается до $-18,2 \pm 0,8$ мВ. Увеличение гидродинамического диаметра липосом со СТК по сравнению с исходными Лип свидетельствует о ее включении в состав везикул. Изменение знака заряда Лип(СТК) на противоположный указывает на взаимодействие стрептокиназы с поверхностью липосом.

Размер Лип, оцененный методом ПЭМ, составляет 20,0–70,0 нм, а Лип(СТК) 220,0–260,0 нм (рис. 1), что больше по сравнению с данными, полученными методом динамического лазерного рассеяния света. По-видимому, это связано с деформацией и слиянием липосом при контакте с коллоидной пленкой в процессе приготовления образца для ПЭМ регистрации.

Сравнительный анализ липосом после их

в плазме крови (рис. 2). На кинетических кривых можно выделить 3 участка (0–45, 45–90, 90–180 мин), соответствующих различным скоростям образования продуктов распада фибрина. На первой стадии происходит медленный рост концентрации Д-димеров: для инъекционной формы стрептокиназы скорость их образования составляет $9 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл · мин), а в случае липосомальной формы – $6 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл · мин). Данное различие может быть связано с меньшим содержанием СТК в Лип(СТК). Для инъекционного раствора стрептокиназы на втором участке кривой во временном интервале 45–90 мин происходит увеличение скорости образования Д-димеров до $13 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл · мин), а их концентрация в плазме крови достигает максимального значения (1,9 мкг/мл). Дальнейшее уменьшение содержания Д-димеров до 1,5 мкг/мл к 180-й минуте, вероятно, связано с «истощением» фибринолитических свойств СТК. На промежуток времени 45–90 мин, по-видимому, приходится наибольшая активность СТК, причем для Лип(СТК) скорость образования Д-димеров выше, чем для инъекционной СТК, и составляет $15 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл · мин). Через 90 мин после введения Лип(СТК) отмечается дальнейший рост концентрации Д-димеров до 2,5 мкг/мл, что, возможно, связано с замедленным высвобождением связанной с липосомами стрептокиназы. Скорость образования продуктов распада фибрина на данном участке составила $6 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл · мин).

Таким образом, наибольшее накопление Д-димеров за счет проявления тромболитического эффекта стрептокиназой происходит в период с 45-й по 90-ю минуту после формирования тромба. Для липосомальной формы СТК наблюдали пролонгированный эффект в течение 180 мин, в то время как для инъекционной формы через 90 мин характерно уменьшение концентрации Д-димеров.

Заключение. Получены липосомы со стрептокиназой с размерами ~60 нм, представляющие собой смесь, состоящую из свободного (66,3 %) и связанного (23,7 %) препарата. На основании анализа кинетики образования Д-димеров в плазме крови собак установлено, что липосомальная форма стрептокиназы обладает пролонгированным эффектом в течение 180 мин.

Список использованных источников

1. Грегориадис, Г. Липосомы в биологических системах / Г. Грегориадис, А. Аллисон; под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – М.: Медицина, 1983. – 383 с.
2. Walde, P. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications / P. Walde, S. Ichikawa // *Biomolecular Engineering*. – 2001. – N 18. – P. 143–177. doi:10.1016/s1389-0344(01)00088-0.
3. Тараховский, Ю. С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ / Ю. С. Тараховский. – М.: Изд-во ЛКИ, 2011. – 280 с.
4. Advanced drug delivery systems for antithrombotic agents / C. F. Greineder [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122, N 9. – P. 1565–1575. doi:10.1182/blood-2013-03-453498.
5. Personal papers in history: papers from the 25th European students conference, Berlin, 17–20 Sept. 2014 / ed.: D. Matthias [et al.]. – Berlin: Charite, 2014. – 37 p.
6. Повышенный уровень Д-димера в плазме крови как маркер высокого риска артериальных тромбозов / Н. В. Фурман [и др.] // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2008. – № 4. – С. 80–84. doi:10.20996/1819-6446-2008-4-4-80-84.
7. Арутюнов, Г. П. Тенектеплаза. Первый опыт применения в Российской Федерации / Г. П. Арутюнов, А. В. Розанов // *Сердце*. – 2006. – № 5(6). – С. 284–286.
8. Справочник биохимика: пер. с англ. / Р. Досон [и др.]. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

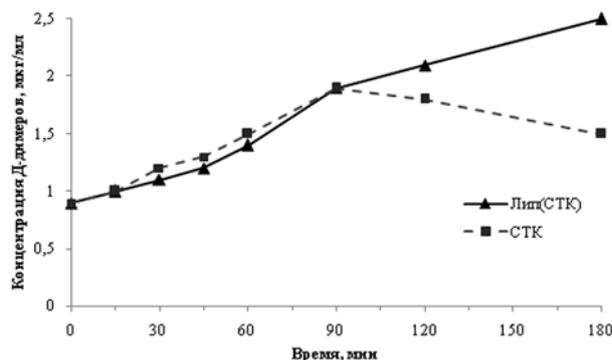


Рис. 2. Кинетические кривые образования Д-димеров (продуктов распада фибрина) в плазме крови после внутривенного введения липосомальной и инъекционной форм стрептокиназы собакам с моделированными артериальными тромбозами. Концентрация Д-димеров у группы контроля (тромбированная артерия) составила 0,9 мкг/мл

Fig. 2. Kinetic curves for the D-dimers formation (fibrin decay products) in blood plasma after the intravenous administration of streptokinase in liposomal and injection form into the modeled thrombosed artery. The concentration of D-dimers in the control group (thrombosed artery) was 0.9 mkg/ml

References

1. Gregoriadis G., Allisson A. *Liposomes in biological systems*. Moscow, Medicina, 1983. 383 p. (in Russian)
2. Walde P., Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering*, 2001, no. 18, no. 4, pp. 143–177. doi:10.1016/s1389-0344(01)00088-0.
3. Tarakhovskii Yu. S. *Intelligent lipide nanocontainers in the targeted delivery of drugs*. Moscow, LKI Publ., 2011. 280 p. (in Russian)
4. Greineder C. F., Howard M. D., Carnemolla R., Cines D. B., Muzykantov V. R. Advanced drug delivery systems for antithrombotic agents. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 9, pp. 1565–1575. doi:10.1182/blood-2013-03-453498.
5. *Personal papers in history: papers from the 25th European students conference, Berlin, 17–20 Sept. 2014*. Berlin, Charite, 2014. 37 p.
6. Furman N. V., Puchiniya N. F., Anisimova O. M., Dovgalevskii P. Ya. Increased plasma level of d-dimer as a marker of high arterial thrombosis risk. *Ratsional'naia Farmakoterapiia v Kardiologii* [Rational Pharmacotherapy in Cardiology], 2008, no. 4, pp. 80–84. doi:10.20996/1819-6446-2008-4-4-80-84. (in Russian)
7. Arutyunov G. P., Rozanov A. V. First experience of application in the Russian Federation. *Russian Heart Journal*, 2006, no. 5(6), pp. 284–286. (in Russian)
8. Doson R., E'liot D., Elliot U., Dzhons K. *Reference Biochemist*. Moscow, Mir Publ., 1991. 544 p. (in Russian)

Информация об авторах

Дубатовка Екатерина Ивановна – мл. науч. сотрудник, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: d_katerina@tut.by.

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, директор, Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by.

Лутик Ирина Леонидовна – мл. науч. сотрудник, Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lutik-irinka@yandex.by.

Яцевич Ольга Николаевна – мл. науч. сотрудник, Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: o-n-y@yandex.ru.

Адзерихо Игорь Эдуардович – д-р мед. наук, профессор, Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: adzerikhoigor@mail.ru.

Для цитирования

Влияние липосомальной формы стрептокиназы на образование Д-димеров / Е. И. Дубатовка [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 54–58.

Information about the author

Dubatouka Katsiaryna Ivanawna – Junior researcher, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: d_katerina@tut.by.

Agabekov Vladimir Enokovich – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director, Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by.

Lutsik Iryna Leanidawna – Junior researcher, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lutik-irinka@yandex.by.

Yatsevich Volha Mikalaewna – Junior researcher, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: o-n-y@yandex.ru.

Adzerikho Ihar Eduardavich – D. Sc. (Medicine), Professor, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: adzerikhoigor@mail.ru.

For citation

Dubatouka K. I., Agabekov V. E., Lutsik I. L., Yatsevich V. N., Adzerikho I. E. Effect of liposomal streptokinase on D-dimers formation. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 6, pp. 54–58. (in Russian).