

*Лутик И. Л., Дубатовка Е. И.*

## **ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА СТРЕПТОКИНАЗЫ КАК АЛЬТЕРНАТИВА КЛАССИЧЕСКОГО ТРОМБОЛИЗИСА**

*Белорусская медицинская академия последипломного образования  
Институт химии новых материалов НАН Беларуси*

Сосудистые заболевания, приводящие к тромбоокклюзии, являются ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире [2]. Системное введение тромболитиков для растворения окклюзирующих тромбов, как превалирующее в клинике направление терапии, зачастую сопряжено с высоким риском геморрагических осложнений вследствие системных побочных эффектов [3]. Перспективным направлением современной медицины является разработка систем локальной доставки (Drug Delivery Systems) тромболитиков к месту тромбоза [4]. Наиболее изученными из них являются липосомы, представляющие собой замкнутые многослойные структуры, состоящие из концентрических липидных бислоев, защищающих включённый препарат. Использование липосомальных форм тромболитических препаратов показало их преимущества перед традиционными. Отмечено ускорение реперфузии при сочетанном введении экзогенных липосом и ультразвука [5].

Целью нашего исследования было изучение свойств липосомальных форм стрептокиназы (СТК) с использованием комплекса лабораторно-инструментальных методов и выбор оптимальной модели для дальнейших экспериментов.

### **Материалы и методы**

В работе использовали липосомы с включенным препаратом стрептокиназы (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Для их получения яичный фосфохолин («Sigma») и холестерин («Acros Organics») в молярном соотношении 2:1 растворяли в хлороформе, а затем выпаривали растворитель до получения однородной пленки. Затем добавляли 40 мМ водный раствор глюкозы и подвергали ультразвуковому (УЗ) воздействию в течение 1–2 минут. Полученную суспензию лиофилизировали, затем добавляли раствор СТК из расчета 22,5 тыс. ЕД/мг липосом, проводили 3 цикла замораживания-оттаивания и снова лиофилизировали. При этом степень включения белка в липосомы составила ~ 75 %.

Визуализацию липосом, растворенных в воде и буферных растворах (табл.), проводили с помощью микроскопа Planar100-МБ (Беларусь).

Для изучения размеров липосом с включённой СТК были получены спектры поглощения суспензии на приборе Solar CM 2203, на основании которых оценивали средний гидродинамический радиус частиц в растворе по методу Геллера [1].

Значения рН и ионной силы растворов

Раствор	рН	Ионная сила, ммоль/л
Вода для инъекций	5,5	0
Изотонический хлорид натрия	7,2	0,154
Реополиглюкин	6,6	0,154
Раствор Рингера	6,6	0,164

Ультразвуковую обработку суспензии липосом проводили при помощи установки для акустоиндуцированного тромболиза (РНПЦ «Кардиология», технопарк БНТУ «Политехник», Беларусь). Рабочая частота генератора, используемая в работе, составила 23 500 Гц, скважность — 30 и 45 %. Использовались волноводы, выполненные из стали марки 12Х18Н10 длиной 23,5 см: плоская головка (ПГ) с отверстием и шаровидная головка (ШГ) без отверстия. Интенсивность ультразвукового воздействия на выходе волновода составила 16,2, 25,1 и 46,2 Вт/см<sup>2</sup>. Время озвучивания — 60, 90, 120 и 180 секунд.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета Microsoft Excel 2003, STATISTICA 6.0 (Version 6-Index, StatSoftInc., США). Уровень доверительной вероятности  $p < 0,05$  рассматривали как статистически значимый.

#### Результаты и обсуждение

*Оценка влияния рН среды и ионной силы растворов на средний гидродинамический радиус липосом.* Добавление к липосомам буферных растворов с различным значением рН и ионной силы (табл.) не показало статистически значимой динамики размера частиц ( $p > 0,05$ ). При этом средний гидродинамический радиус составил  $124 \pm 7$  нм. Наименьшее значение (113 нм) отмечалось при добавлении к липосомам воды для инъекций.

*Оценка влияния температурных режимов и времени хранения на размер липосомальных ассоциатов.* При высокой концентрации липосом (1 мг/мл) наблюдали образование нестабильных ассоциатов размером 1–20 мкм, состоящих из более мелких частиц (~ 250 нм). Повышение температуры приводило к изменению их размеров. При температуре +4 °С превалировали ассоциаты диаметром 1–5 и 5–10 мкм (49 и 37 % соответственно), доля частиц от 10 до 20 мкм составила 14 %, что говорит о склонности липосом к образованию агрегатов в данных условиях. С увеличением температуры до +20 °С достоверно увеличилось количество частиц размером до 5 мкм (69 %,  $p < 0,05$ ). При +37 °С наблюдали увеличение числа крупных липосомальных ассоциатов (10–20 мкм) до 18 %.

Увеличение времени хранения при температуре +20 °С также приводило к агрегации частиц. При этом через 15 минут их доля составила 18 %, что превышало исходное значение на 15 % ( $p < 0,05$ ).

Оценка влияния ультразвука на средний гидродинамический радиус липосом. При воздействии ультразвука на растворы липосом было отмечено явление дезагрегации частиц, существенное влияние на которое оказывали форма головки волновода и интенсивность. Изменение уровня скважности не приводило к статистически значимой динамике размера частиц ( $p > 0,05$ ).

Наименьшая дезагрегация отмечалась при воздействии волновода с плоской головкой, при уровне интенсивности 16,2 и 46,2 Вт/см<sup>2</sup> и скважности 45 % (рис.), при этом динамика размера частиц составила менее 10 % от исходного ( $p > 0,05$ ). Использование шаровидной головки волновода показало статистически значимое уменьшение размера частиц при уровне интенсивности 46,2 Вт/см<sup>2</sup> и скважности 30 и 45 % ( $p < 0,05$ ). Уменьшение концентрации липосом в растворе с 1 до 0,5 мг/мл показало сходную динамику размера частиц после воздействия ультразвука. Наиболее оптимальным временем озвучивания в растворах обеих концентраций было 120 секунд (рис.), при котором значение гидродинамического радиуса составило 102 (ШГ, 45 %) и 107 нм (ШГ, 30 %).

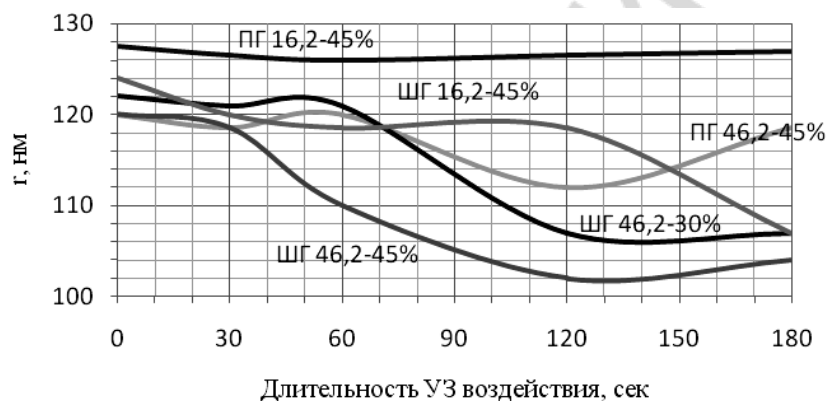


Рис. Динамика среднего гидродинамического радиуса липосом с включенным препаратом СТК в концентрации 1 мг/мл, растворенных в 1 мл 0,15 М изотонического хлорида натрия, при воздействии НЧ УЗ различной интенсивности, скважности и времени озвучивания, использовании волноводов с различными формами головок *in vitro*

*Примечание.* Типы волноводов: ПГ — плоская головка с отверстием, ШГ — шаровидная головка без отверстия. Значения интенсивности ультразвука — 16,2 и 46,2 Вт/см<sup>2</sup>; значения скважности — 30 и 45 %; фиксированное время озвучивания — 30, 60, 90, 120 и 180 секунд.

## Выводы

Значение среднего гидродинамического радиуса липосом при добавлении изотонических растворов с различными значениями рН и ионной силы составило  $124 \pm 7$  нм. Оптимальным температурным режимом для разбавления лиофилизированных частиц является +20 °С. Хранение растворов липосом в течение 15 минут приводило к образованию ассоциатов размером 10–20 мкм. Воздействие УЗ различной интенсивности и скважности вызывало их дезагрегацию. Были выбраны оптимальные параметры озвучивания липосом: интенсивность 46,2 Вт/см<sup>2</sup>, скважность 45 %, время 120 секунд.

использование шаровидной головки волновода без отверстия, время воздействия 120 секунд.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Кудряшов, С. Ю. Коллоидная химия : лабораторный практикум / С. Ю. Кудряшов, Л. А. Онучак. Самара : Универс-групп, 2006. 48 с.
2. *RGD-modified* liposomes targeted to activated platelets as a potential vascular drug delivery system / A. Sen Gupta [et al.] // *Thromb. Haemost.* 2005. Vol. 95. P. 106–114.
3. *The GUSTO* angiographic investigators. The effects of tissue plasminogen activator, Streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* 1993. Vol. 329. P. 1615–1622.
4. *Polyelectrolyte* complexes stabilize and controllably release vascular endothelial growth factor / M. Huang [et al.] // *Biomacromolecules.* 2007. Vol. 8, № 5. P. 1607–1614.
5. *Ultrasound-facilitated* thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes / S. D. Tiukinhoy-Laing [et al.] // *Thrombosis Research.* 2007. Vol. 119. P. 777–784.

*Lutsik I. L., Dubatouka K. I.*

### **Liposomal form of streptokinase as an alternative to the classical thrombolysis**

The investigation of liposomes as drug having advantages before classical thrombolytic therapy was carried. Influence of ionic force, pH, temperature, a storage time and ultrasound parameters on the size of the liposomal form of streptokinase is studied. It is shown that particles in a solution form associates, that are easily destroyed under the influence of ultrasound influence. The optimal ultrasound exposure modes that can be used for further experiments held.