

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.127-005.8-009.7:615.273.55]-092.9-036

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124>

Поступила в редакцию 24.01.2024

Received 24.01.2024

И. Э. Адзериho¹, В. Е. Агабеков², Т. Э. Владимирская¹,
Е. И. Дубатовка², А. В. Жилкевич¹

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОЙ СИСТЕМЫ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ТЕНЕКТЕПЛАЗЫ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

Аннотация. Разработана новая система адресной доставки тканевого активатора плазминогена тенекеплазы для восстановления коронарного кровотока при остром инфаркте миокарда в эксперименте на животных.

Новая система адресной доставки фибринолитика состоит из нативной («свободной») и инкапсулированной в липосомы («связанной») форм тенекеплазы (60 и 40 % соответственно), которые конъюгированы через карбоксилированный декстран с фибрин-специфичными моноклональными антителами Fnl-3С.

Установлены физико-химические характеристики полученных липосом, конъюгированных с фибрин-специфичными моноклональными антителами (иммунолипосомы) с тенекеплазой: гидродинамический диаметр ~76–77 нм, дзета-потенциал ~(-33) мВ, индекс полидисперсности ~0,55. Модификация липосом фибрин-специфичными моноклональными антителами не приводит к изменению активности тромболитика.

Выживаемость животных с острым инфарктом миокарда при использовании иммунолипосом составляет ~90 %, при применении липосомальной и нативной форм препарата – 80 %.

При использовании иммунолипосомальной системы доставки фибринолитика у животных с острым инфарктом миокарда свободный просвет инфаркт-связанной артерии увеличивается ($p < 0,05$) на 26 % по сравнению с применением липосомальной системы и на 46 % по сравнению с использованием нативной тенекеплазы. При этом масса ишемизированного миокарда на фоне тромболитической терапии с применением иммунолипосом уменьшается ($p < 0,05$) на 16 % по сравнению с таковой при использовании липосомальной системы и на 26 % при применении нативной тенекеплазы.

Новая система адресной доставки тенекеплазы обеспечивает эффективный и безопасный тромболитизис в эксперименте на животных.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, тенекеплаза, липосомы, система адресной доставки, фибрин-специфичные моноклональные антитела

Для цитирования: Эффективность новой системы адресной доставки тенекеплазы при остром инфаркте миокарда в эксперименте *in vivo* / И. Э. Адзериho [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 116–124. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124>

Ihar E. Adzerikho¹, Vladimir E. Agabekov², Tat'yana E. Vladimirskaaya¹,
Katsiaryna I. Dubatouka², Aliona V. Zhilkevich¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

EFFICACY OF A NEW SYSTEM OF TARGETED DELIVERY OF TENECTEPLASE IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION IN AN *IN VIVO* EXPERIMENT

Abstract. A new system of targeted delivery of tissue plasminogen activator tenecteplase for restoration of coronary blood flow in acute myocardial infarction in animal experiments was developed.

The new system of targeted delivery of fibrinolytic consists of native (“free”) and encapsulated (“bound”) tenecteplase in liposomes, in the percentage ratio (60 and 40 %, respectively), which are conjugated through carboxylated dextran with fibrin-specific monoclonal antibodies Fnl-3C.

The physicochemical characteristics of the obtained liposomes conjugated with fibrin-specific monoclonal antibodies (immunoliposomes) with tenecteplase were determined: immunoliposomes have a hydrodynamic diameter of ~76–77 nm, a zeta potential of ~(-33) mV, a polydispersity index of ~0.55. Modification of liposomes with fibrin-specific monoclonal antibodies does not alter thrombolytic activity.

When using immunoliposomes the survival rate of animals with acute myocardial infarction is ~90 %, liposomal and native form of the drug – 80 %.

The use of immunoliposomal delivery system in animals with acute myocardial infarction leads to an increase in the free lumen of the infarct-related artery ($p < 0.05$) by 26 % compared to the liposomal delivery system and by 46 % compared to native tenecteplase. At the same time, the mass of ischemic myocardium on the background of thrombolytic therapy with

immunoliposomes decreases ($p < 0.05$) by 16 % in rats in comparison with the liposomal system and by 26 % in comparison with native tenecteplase.

The new system of targeted delivery of tenecteplase provides effective and safe thrombolysis in animal experiment.

Keywords: acute myocardial infarction, tenecteplase, liposomes, targeted delivery system, fibrin-specific monoclonal antibodies

For citation: Adzerikho I. E., Agabekov V. E., Vladimirkaya T. E., Dubatouka K. I., Zhilkevich A. V. Efficacy of a new system of targeted delivery of tenecteplase in acute myocardial infarction in an *in vivo* experiment. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya meditsynskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 116–124 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-116-124>

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения во всем мире [1]. При этом острый артериальный тромбоз выступает одним из пусковых механизмов развития инфарктов миокарда и головного мозга, а также ишемии нижних конечностей.

Основным нехирургическим методом восстановления коронарного кровотока при остром инфаркте миокарда (ОИМ) является тромболитическая терапия (ТЛТ). На сегодняшний день использование в ведущих клиниках мира тромболитических препаратов (ТП) позволило снизить смертность от ОИМ до 5–7 % [2]. В то же время незначительная степень реперфузии, а также высокий риск возникновения геморрагических осложнений ТЛТ диктуют необходимость разработки новых подходов к лечению ОИМ.

В настоящее время использование в эксперименте и клинической практике систем локальной доставки (Drug Delivery Systems, DDSs) ТП позволяет значительно повысить эффективность ТЛТ и уменьшить частоту развития ее побочных эффектов [3, 4]. Применение липосом в DDSs для инкапсуляции ТП представляется наиболее перспективным, что обусловлено их биосовместимостью с организмом, защитой лекарственного препарата от контакта с ферментативными системами, а также от преждевременной его инактивации [5, 6]. Одним из способов применения DDS-тромболитиков является модификация поверхности липосом путем фиксации к ней «сайт-распознающих» компонентов, например антифибриновых [6–8] или антиагрегатных моноклональных антител [9].

Ранее нами была разработана липосомальная форма стрептокиназы (СК) для создания адресной доставки препарата¹ [5]. Использование липосом в качестве DDS улучшает фармакологический профиль СК – увеличивается период ее полувыведения за счет двухфазного высвобождения ТП [6, 7]. Это связано с наличием в составе липосомальной системы доставки «связанной» (инкапсулированной в липосомы) и «свободной» (нативной) СК, что приводит сначала к действию «свободной» фракции с быстрым фибринолитическим эффектом и последующему выходу из липосом «связанной» СК, обеспечивающей пролонгированную активацию фибринолиза.

СК, как один из эффективных тромболитиков, уступает высокоселективным ТП по скорости, степени и полноте фибринолиза по ряду причин: отсутствием у СК фибрин-селективности, коротким периодом ее полувыведения, высоким риском системных побочных эффектов [5, 6, 10, 11]. С целью исключения указанных недостатков разработана новая система адресной доставки СК, включающая иммунолипосомальную и нативную формы тромболитика [6, 7, 12]. В экспериментах *in vitro* показано преимущество иммунолипосомальной формы СК в сравнении с нативным препаратом – через 3 ч после ее введения степень тромболиза увеличивается в среднем на 30 % [6, 10]. При этом действие иммунолипосомальной СК усиливается за счет целевой ее локализации в сайтах фибрина оставшейся тромболитической массы, что и приводит к существенному восстановлению просвета сосуда. Необходим фибринолиз краевой (пристеночной) части тромба, поскольку от полноты восстановления просвета тромбированного сосуда зависит частота развития ретромбоза/реоклюзий и, соответственно, реинфарктов/смертей. В отличие от центральной, пристеночная часть тромба наиболее трудно поддается лизису, что обусловлено низким уровнем проникновения препарата в эту область.

Использование иммунолипосомальной формы СК в адресной системе доставки существенно снижает риск геморрагических осложнений и защищает от воздействия нейтрализующих циркулирующих антител [13].

¹ Способ получения липосом, содержащих стрептокиназу: патент BY21995 / И. Э. Адзерихо, Т. Е. Владимирская, В. Е. Агабеков, Е. И. Чернявский, Г. К. Жавнерко, Г. В. Шерстюк, И. Л. Лутик, Е. И. Дубатовка. – Минск, 2018.

Выдвинуто предположение, что использование иммунолипосомальной формы тканевого активатора плазминогена теноктеплазы (ТНК) при ОИМ позволит улучшить фармакологический профиль и фибрин-специфичные свойства препарата, увеличить степень восстановления просвета окклюзированного сосуда за счет фибринолиза не только центральной, но и периферической части тромба, а также снизить риск развития побочных эффектов.

Цель настоящего исследования – изучить физико-химические свойства и эффективность использования новой адресной системы доставки теноктеплазы в лечении острого инфаркта миокарда в эксперименте на лабораторных животных (крысах).

Материалы и методы исследования. *Методы получения липосомальных форм ТНК.* В качестве активатора плазминогена использовали ТНК – тромболитик третьего поколения высокой фибрин-специфичности («Метализе», Boehringer Ingelheim, Германия). ТНК разводили в изотоническом растворе натрия хлорида и инкапсулировали в обычные и фибрин-специфичные липосомы.

Липосомы получали путем гидратации липидной пленки, формируемой из смеси стабилизированного α -токоферолом холестерина и яичного или соевого фосфатилхолина (ФХ) в хлороформе в соотношении 1 : 1,5 [6, 7, 13].

Липидную пленку гидратировали дистиллированной водой и подвергали ультразвуковому воздействию с частотой 35 кГц в течение 10 мин (ультразвуковая ванна Bandelin Sonorex, Германия), а полученный золь лиофилизировали (лиофильная сушка Labcongol Free Zone 1.0, США). После этого к пустым липосомам добавляли ТНК (33–50,0 мас.%) для получения ее липосомальной формы (ЛТНК) в соотношениях липидов и активатора плазминогена 1 : 1; 1,5 : 1; 2 : 1, перемешивали и проводили 5 циклов замораживания-оттаивания (от -20 до $+37$ °С) для увеличения доли активного компонента в везикулы, после чего снова лиофилизировали, предварительно добавив D-маннитол в качестве криопротектора для защиты липидной мембраны и предотвращения инактивации ТНК в процессе высушивания.

Липосомальная система доставки ТНК представляла собой суспензию, содержащую «свободную» в растворе и «связанную» с липосомами ТНК (ЛТНК-СД) [6].

Для визуализации липосом с тромболитиком использовали гидрофобные флуоресцентные наночастицы типа «ядро–оболочка» CdSe/ZnS/олеиламин (ФНЧ). Стабилизированные жирным амином ФНЧ, имеющим высокое сродство к остаткам жирных кислот липидов, вводили в липосомы на стадии формирования пленки. При этом ФНЧ находились внутри бислоя в области жирных «хвостов» липидов и удерживались там благодаря гидрофобным взаимодействиям. Сформированные липосомы с ТНК, содержащие ФНЧ, идентифицировали и визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Planar100-МБ (Беларусь) по спектрам испускания ФНЧ при $\lambda = 520$ нм и 400-кратном увеличении.

Для определения концентрации «свободного» и «связанного» тромболитика липосомы ресуспендировали в воде и центрифугировали при 20 000 об/мин (Allegra 64R, Beckman Coulter, США) в течение 1 ч. При этом анализируемый супернатант содержал «свободную» ТНК, а осадок – «связанную». Эффективность включения ТНК и ее содержание в липосомах определяли стандартным биохимическим методом Бредфорда [14–16], основанном на связывании белками анионной формы красителя Кумассио G-250 [7] с отщеплением *n*-нитроанилина.

Для адресной доставки тромболитика использовали фибрин-специфичные АТ FnI-3С класса IgG2а, которые предварительно ковалентно связывали с карбоксиметилдекстраном (КМД-АТ), применяя карбодимидный метод. Модифицированные антителами липосомы (иммунолипосомы) готовили непосредственно перед использованием: к лиофилизированному порошку ЛТНК добавляли раствор конъюгата КМД-АТ (электростатическое связывание полисахарида с поверхностью липосом и формирование комплекса ЛТНК/КМД-АТ), конечная концентрация липосом составила 1 мг/мл (по липидам), конъюгата – 0,75 мг/мл.

Липосомальная система доставки ТНК с соотношением липидов и ТНК 1 : 1 после лиофилизации содержала 60–75 % «связанного» и ~25–40 % «свободного» тромболитика. Изменение данного соотношения до необходимого (40 и 60 %) осуществляли путем добавления раствора ТНК к готовым липосомам непосредственно перед его введением экспериментальным животным.

Аналогічным образом готовили адресную (иммунолипосомальную) систему доставки тромболитика ИЛТНК-СД в следующем соотношении: «связанный» – 40 %, «свободный» – 60 %.

Размеры и форму различных форм ТНК изучали методами просвечивающей электронной (JEM-100 CX, Япония), атомно-силовой (Nanoscope-3D MultiMode, Veeco, США) микроскопии и спектрофлуориметрически (Solar CM 2203, Беларусь).

Параметры стабильности коллоидных растворов тромболитика и его липосомальных форм определяли по величине дзета-потенциала (электрофоретической подвижности частиц) на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Протеолитическую активность лиофилизированных и ресуспендированных в воде образцов ТНК определяли по накоплению *n*-нитроанилина, образующегося при гидролизе хромогенного субстрата S-2288 (температура 37 °С, постоянное перемешивание в течение 5 мин).

Исследования in vivo. При проведении экспериментальных исследований руководствовались методическими указаниями «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91. М., 1992), ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика».

Работа проведена на 50 белых крысах массой 280–310 г, содержащихся в стационарных условиях вивария БГМУ на полноценном стандартном пищевом рационе согласно установленным нормам. С целью маркировки различные участки шерстного покрова окрашивали с помощью спиртового раствора пикриновой кислоты.

Для создания модели ОИМ животных предварительно наркотизировали: после премедикации фентанилом (0,0005 мг/кг) и дроперидолом (0,1 мг/кг) им внутримышечно вводили тиопентал натрия (10 мг/кг). Для поддержания анестезии по мере необходимости внутривенно болюсно вводили тиопентал натрия (10 мг/кг) и фентанил (0,0003 мг/кг), после чего животных подключали к аппарату искусственной вентиляции легких. Доступ к сердцу выполняли через вертикальный разрез длиной 3 см в левой половине грудной клетки в проекции среднеключичной линии. После выделения сердца из околосердечной сумки на переднюю его поверхность в области верхней трети левой коронарной артерии помещали фильтровальную бумагу, которую заранее насыщали раствором FeCl₃ (12,5 %). Время действия химического агента на сосуд составило 3 мин. Затем фильтровальную бумагу удаляли и место воздействия на миокард несколько раз промывали физиологическим раствором, после чего выполняли послойное ушивание раны.

Все животные были разделены на пять групп, по 10 крыс в каждой: модель ОИМ без лечения и с ТЛТ, ТНК, ЛТНК-СД и ИЛТНК-СД. В контрольной группе физиологический раствор интактным животным вводили внутривенно. Растворы фибринолитика вводили внутривенно болюсно из расчета 0,5 мг/кг тела животного (коэффициент пересчета доз 6,0) через 2 ч после моделирования ОИМ. Для потенцирования действия ТП в процессе тромболизиса и профилактики осложнений использовали антикоагулянт гепарин в дозе 20 тыс. ЕД/кг.

Период наблюдения за животными составил 24 ч. По истечении срока наблюдения животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутрибрюшинного тиопенталового наркоза (1 мл 5 %-ного тиопентала натрия на 100 г тела животного).

Изменение содержания в сыворотке крови крыс тропонина Т, Д-димера, креатинкиназы-МВ определяли с помощью наборов Rat Troponin T Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory, Китай), Rat D-Dimer Elisa Kit (Bioassay Technology Laboratory, Китай), КФК-МВ («Анализ Мед», Беларусь). Оптическую плотность измеряли на иммуноферментном анализаторе SIRIO S SEAC (Италия).

Съемку ЭКГ осуществляли по стандартной методике на компьютерном электрокардиографе «Поли-Спектр-8/Л» («Нейрософт», Россия) в стандартных отведениях I, II, III и усиленных отведениях от конечностей aVR, aVL, aVF. ЭКГ проводили исходно (до ОИМ), а также сразу после моделирования ОИМ и через 1, 2, 6, 24 ч.

Морфологические исследования. У животных непосредственно после забора крови извлекали сердце. Иссеченные сегменты фиксировали в 10 %-ном формалине в течение 24 ч. Затем промывали в проточной воде, обезжировали в спиртах восходящей концентрации (70-, 80-, 96 %-ный абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-ксилол, ксилол, ксилол-парафин

и заливали в парафин по стандартной методике [16]. На микротоме Leica RM2265 (Германия, 2008 г.) из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином, MSB (для определения «возраста» фибрина) и ГОФП (для исследования ранних ишемических повреждений миокарда).

Для изучения микропрепаратов и изготовления микрофотографий использовали световые микроскопы с программным обеспечением (Leica, Германия; Motic China Group Co., Китай).

Морфометрическую оценку степени свободного просвета сосудов (ССПС) проводили при помощи программ количественной микроскопии для анализа и обработки изображений Leica-Qwin (версия 1.56). Определяли площадь тромба (S_1), площадь просвета сосуда (S_2), ССПС рассчитывали по отношению площади просвета тромба к сумме площади тромба и площади просвета сосуда ($ССПС = S_2/S_1 + S_2$).

Определение относительной массы ишемизированного миокарда. Измерение относительной массы поврежденного миокарда осуществляли методом гистохимического окрашивания поперечных срезов сердца 1%-ным раствором 2,3,5-трифенитетразолия хлорида (MP Biomedicals, США). Срезы инкубировали в указанном растворе в течение 15 мин, при этом жизнеспособный миокард окрашивался в ярко-красный цвет, а участки ишемизированного миокарда оставались неокрашенными. С помощью офтальмологических инструментов иссекали неокрашенные участки во всех сегментах миокарда и взвешивали их. Полученную абсолютную сумму всей зоны кардиальных сегментов инфаркта пересчитывали в процентах к общей массе сердца и получали относительную массу пораженных участков.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ STATISTICA 10.0 (Statsoft, США). Для проверки нормальности распределения данных использовали метод Колмогорова–Смирнова, а также показатели эксцесса и асимметрии. Различия между выборками оценивали с помощью U -теста Манна–Уитни и теста Краскелла–Уоллеса для независимых выборок. Результаты представлены в виде медианы (Me) – значение, справа и слева от которого на оси значений признака располагаются равные количества значений признака данной выборки; 25-й и 75-й перцентили. Достоверным считалось различие при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Размер липосом с ТНК составил ~96 нм, индекс полидисперсности (PDI) – ~0,7. После модификации ЛТНК карбоксиметилдекстраном или конъюгата КМД с антителами их размер достигал ~76–77 нм, а PDI – ~0,45 и ~0,55 соответственно. Данные изменения могут быть связаны с уменьшением агрегации и слипания липосом в водном растворе за счет образования на их поверхности гидрофильной оболочки из полисахарида. Модификация поверхности липосом антителами к фибрину FnI-3C (иммунолипосомы) практически не изменяла их физико-химические свойства.

Добавление КМД или КМД/АТ приводило к уменьшению абсолютного значения дзета-потенциала от ~(-59) мВ для ЛТНК до ~(-51) и ~(-33) мВ у ЛТНК/КМД и ЛТНК/КМД-АТ соответственно. Во всех случаях липосомы оставались стабильными. При хранении готовых зелей в течение первых суток их размер и дзета-потенциал изменялись незначительно и составляли ~120 нм, -52 мВ для ЛТНК и ~80 нм и -48 мВ для ЛТНК/КМД.

Включение наночастиц в состав липосом приводило к увеличению их гидродинамического диаметра от ~96 нм для ЛТНК до ~437 нм в случае ЛТНК с ФНЧ и ~571 нм для модифицированных антителами везикул ЛТНК/КМД-АТ с ФНЧ.

Следует отметить, что липосомы из соевого ФХ обладали большей коллоидной устойчивостью значения дзета-потенциала (~57 мВ) и меньшим гидродинамическим диаметром (~140 нм) по сравнению с липосомами из яичного ФХ, что может быть обусловлено более жесткой и менее текучей мембраной соевых липосом, из-за чего они слабее агрегируют.

Ранее на примере СК было показано [6], что для достижения максимального тромболитического эффекта наиболее оптимальным является соотношение «связанной» и «свободной» форм СК 40 и 60 %. Это обусловлено первоначальным быстрым фибринолитическим действием нативной («свободной») формы и последующим выходом из липосом «связанного» тромболитика, обеспечивающей пролонгированный фибринолиз.

При этом для ЛТНК из соевого ФХ доля «связанной» формы ТНК составляла ~76 % в течение 24 ч и при хранении при +4 °С уменьшалась до ~59 %, а через 48 ч – до ~54 %.

Для ЛТНК из яичного ФХ доля «связанной» формы ТНК (~36 %) не изменялась в течение 24 ч (+4 °С), что указывает на незначительное высвобождение ТНК из липосом в данных условиях и на стабильность золя, что дает возможность его использования в течение первых суток практически без потери его активности.

По своим физико-химическим свойствам ЛТНК, полученные как из соевого, так и из яичного ФХ, полностью отвечали требованиям по проведению эффективного и безопасного тромболитического действия [6, 7].

Протеолитическая активность липосомальной формы ТНК составила $58,0 \pm 7,0$ и $36,0 \pm 11,0$ % от номинального количества нативного препарата для соевого и яичного ФХ.

Инкубация разведенных образцов золь при +4 °С в течение 24 и 48 ч незначительно (на 5–10 %) уменьшала активность ТНК, что указывает на их стабильность и на возможность использовать приготовленные золи без существенной потери их активности.

ЛТНК обладала коллоидной устойчивостью в течение 2 ч после приготовления, значения дзета-потенциала практически не изменялись и составили –45...–55 мВ, а значения гидродинамического диаметра – 100–250 нм. При длительном хранении (более суток) ЛТНК агрегируют и их нельзя использовать.

Детектируемая протеолитическая активность ЛТНК составляла ~83 %, что позволяло рассчитывать эффективную дозировку для введения экспериментальным животным и провести сравнительную оценку с тромболитическим действием нативных форм данного препарата.

На планарной поверхности кремния ЛТНК имеют округлую форму. Размер везикул по высоте 10–35 нм, диаметр 20–80 нм; для ЛТНК/КМД и ЛТНК/КМД-АТ размер по высоте 20–40 нм, диаметр 280–360 и 90–250 нм соответственно.

Модификация липосом конъюгатом КМД-АТ не приводила к изменению активности тромболитика.

При использовании иммунолипосом выживаемость животных с ОИМ составляла ~90 %, при применении липосомальной и нативной форм препарата – 80 и ~80 % соответственно.

Исследование ЭКГ крыс до оперативного вмешательства показало, что у всех животных был правильный синусовый ритм, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в сегменте QRS-T. При анализе ЭКГ группы с моделью ОИМ у большинства (70 %) животных имели место изменения, характерные для инфаркта миокарда: элевация сегмента ST и появление зубца Q.

Микроскопическое исследование препаратов сердца, выведенных через 24 ч после моделирования ОИМ у животных, показало наличие обтурирующих или субобтурирующих тромбов в инфаркт-связанной артерии (ИСА). В миокарде наблюдали неравномерное его кровенаполнение, диффузно-очаговое венозно-капиллярное полнокровие, стаз и сладж эритроцитов, плазмостаз. Отмечались очаги волнистой деформации миоцитов, контрактуры, избирательное окрашивание миоцитов с преднекротическими и некротическими изменениями, формирование вокруг участков некроза демаркационного лейкоцитарного вала, участки незрелой грануляционной ткани, миомаляция, мелкоочаговая макрофагальная инфильтрация. При окрашивании методом MSB тромбов в ИСА наблюдались фрагменты «зрелого» и «старого» фибрина. Таким образом, у всех выживших животных выявлены морфологические признаки развития ОИМ.

При оценке ЭКГ после проведенного тромболитического действия липосомальными формами ТНК наблюдали снижение сегмента ST более чем на 50 % от исходного во II отведении, что свидетельствовало об эффективной реперфузии с восстановлением кровотока.

Исследование динамики кардиоспецифических маркеров показало значительное снижение ($p < 0,05$) содержания КФК-МВ и тропонина Т и увеличение ($p < 0,05$) содержания Д-димеров в сыворотке крови животных после введения липосомальных форм ТНК по сравнению с таковыми после применения нативной формы тенектеплазы (табл. 1).

Результатом тромболитического действия ИЛТНК-СД препарата являлось статистически значимое уменьшение объема ишемического повреждения сердца к моменту завершения эксперимента ($p < 0,05$) по сравнению с нативной ТНК и ЛТНК-СД (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Уровни кардиоспецифических маркеров и Д-димеров в сыворотке крови экспериментальных животных при введении различных форм тенектеплазы

Table 1. Levels of cardiac-specific markers and D-dimers in the blood serum of experimental animals after administration of different-form tenecteplase

Маркер	ТНК	ЛТНК-СД	ИЛТНК-СД	ОИМ	Контроль	<i>p</i>
	1	2	3	4	5	
КФК-МВ, Ед/л	415,1* (357,2; 477,8)	307,4* (199,4; 394,4)	301,1* (287,2; 347,3)	422,6* (381,3; 573,7)	130,4 (122,4; 136,1)	$p_{1-2} < 0,05, p_{1-3} < 0,05,$ $p_{1-4} < 0,05, p_{2-4} < 0,05,$ $p_{3-4} < 0,05$
Тропонин Т, нг/л	4,2* (3,1; 6,9)	3,3* (2,9; 3,6)	3,0* (2,0; 3,4)	5,9* (5,1; 7,0)	2,7* (1,9; 3,5)	$p_{1-2} < 0,05, p_{1-3} < 0,05,$ $p_{2-4} < 0,05, p_{3-4} < 0,05$
Д-димеры, нг/мл	22,2* (21,3; 41,5)	29,3* (21,6; 34,3)	32,3* (2,1; 34,9)	15,7* (12,0; 20,5)	6,7 (3,9; 8,9)	$p_{1-2} < 0,05, p_{1-3} < 0,05,$ $p_{1-4} < 0,05, p_{2-4} < 0,05,$ $p_{3-4} < 0,05, p_{2-3} < 0,05$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

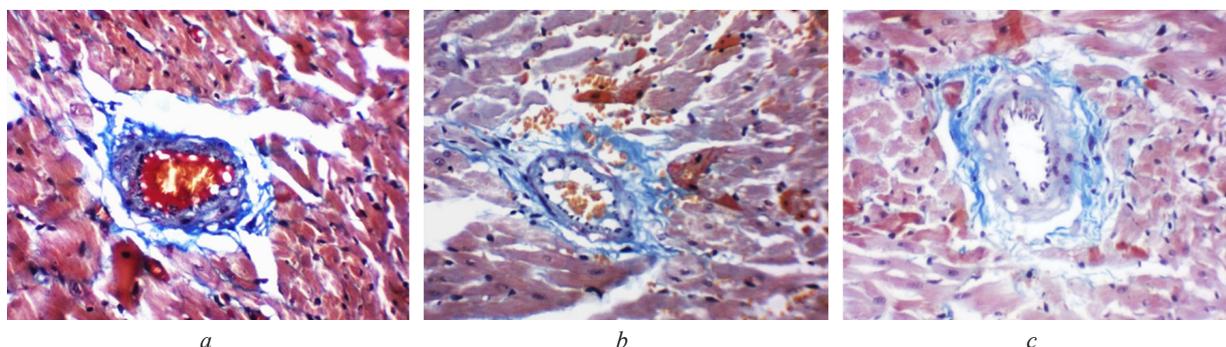
Т а б л и ц а 2. Масса ИМ при введении различных форм тенектеплазы, %

Table 2. Weight of MI after administration of different-form tenecteplase, %

Исследуемая зона	ТНК	ЛТНК-СД	ИЛТНК-СД	ОИМ	<i>p</i>
	1	2	3	4	
Зона ишемии	41 (29; 45)	31 (24; 40)	15 (9; 23)	51 (31; 54)	$p_{1-2} < 0,05, p_{1-3} < 0,05,$ $p_{1-4} < 0,05, p_{2-3} < 0,05,$ $p_{2-4} < 0,05, p_{3-4} < 0,05,$
Здоровый миокард	59 (48; 61)	69 (63; 70)	85 (74; 87)	49 (43; 51)	$p_{1-2} < 0,05, p_{1-3} < 0,05,$ $p_{1-4} < 0,05, p_{2-3} < 0,05,$ $p_{2-4} < 0,05, p_{3-4} < 0,05$

В нашем эксперименте ТЛТ с использованием разных форм тромболитика вызывала полный или частичный лизис тромбов (см. рисунок). При лечении нативной ТНК у всех экспериментальных животных отмечался неполный тромболитизис в ИСА с сохранением фибрина, располагающегося пристеночно и в центральной части просвета коронарной артерии (КА) (см. рисунок, *b*). При лечении ЛТНК-СД и ИЛТНК-СД фибрин в тромбах наблюдался в следовых количествах или отсутствовал.

Морфометрический анализ показал, что ССПС значительно ($p < 0,05$) увеличилась при использовании иммунолипосомальной формы доставки ТНК (88,9 [73,2; 99,8]) по сравнению с липосомальной (62,4 [57,9; 69,0]). Наименьшую ССПС в ИСА наблюдали при использовании нативной ТНК (43,3 [32,4; 55,6]).



Микроскопические изменения в ИСА крыс с ОИМ. Репрезентативные изображения КА, окрашенных MSB: исходный тромб (*a*), тромболитизис ЛТНК-СД (*b*), тромболитизис ИЛТНК-СД (*c*)

Microscopic changes in the ISA of rats with AMI. Representative images of MSB-stained CAs: original thrombus (*a*), thrombolysis of LTNK-SD (*b*), thrombolysis of ILTNK-SD (*c*)

Уменьшение объема ишемического повреждения миокарда и полное восстановление просвета ИСА при использовании иммунолипосомальной системы доставки ТНК обусловлено ее оптимальной структурой, содержащей 40 % «связанной» и 60 % «свободной» форм тромболитика и наличием на поверхности липосом АТ к фибрину.

Заключение. Разработана новая система адресной доставки ТНК, представляющая собой комбинацию иммунолипосомальной формы препарата с нативной в процентном соотношении 40/60.

Установлены физико-химические характеристики полученных иммунолипосом: иммунолипосомы имеют гидродинамический диаметр ~76–77 нм, дзета-потенциал ~(-33) мВ, индекс полидисперсности ~0,55.

При использовании ИЛТНК-СД у животных с ОИМ свободный просвет ИСА увеличивается на 26 % по сравнению с группой ЛТНК-СД и на 46 % по сравнению с группой нативной ТНК. При этом масса ишемизированного миокарда у крыс на фоне ТЛТ с применением ИЛТНК-СД уменьшается на 16 % по сравнению с группой ЛТНК-СД и на 26 % по сравнению с группой нативной ТНК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках проекта «Разработать метод адресной доставки лекарственных средств для тромболитической терапии острого инфаркта миокарда» ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (2019/2021 гг.). Авторы выражают особую благодарность Министру здравоохранения Республики Беларусь Пиневицу Дмитрию Леонидовичу за поддержку и постоянное внимание к выполнению данного проекта.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the project “Develop a method for targeted delivery of drugs for thrombolytic therapy of acute myocardial infarction” of the State Public Research Institute “Basic and Applied Sciences – Medicine” (2019/2021). The authors are very grateful to the Minister of Healthcare of the Republic of Belarus Pinevich Dmitry Leonidovich for support and constant attention to the implementation of this project.

Список использованных источников

1. Global Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 / G. A. Roth [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2017. – Vol. 70, N 1. – P. 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>
2. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction / R. T. van Domburg [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 46, N 1. – P. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.047>
3. Zhang, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation / H. Zhang // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1522. – P. 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2
4. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators / S. Koudelka [et al.] // *J. Control. Release.* – 2016. – Vol. 227. – P. 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.019>
5. Получение комплексных препаратов на основе липосомальной формы стрептокиназы и их фармакокинетические характеристики / Е. И. Дубатовка [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 6. – С. 50–57.
6. Fibrin-specific liposomes as a potential method of delivery of the thrombolytic preparation streptokinase / I. E. Adzerikho [et al.] // *J. Thrombosis Thrombolysis.* – 2022. – Vol. 53, N 2. – P. 313–320. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02614-0>
7. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the vivo experiment / I. Adzerikho [et al.] // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2023. – Vol. 13, N 3. – P. 811–821. <https://doi.org/10.1007/S13346-022-01242-2>
8. Targeted Delivery of Plasminogen Activators for Thrombolytic Therapy: An Integrative Evaluation / Y.-H. Ma [et al.] // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, N 18. – Art. 3407. <https://doi.org/10.3390/molecules24183407>
9. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis / C. L. Pawlowski [et al.] // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 128. – P. 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.012>
10. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue / L. Giodini [et al.] // *Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 13, N 2. – P. 583–599. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.012>
11. Li, W. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology / W. Li, T. M. McIntyre, R. L. Silverstein // *Redox Biol.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.001>
12. The efficacy and the safety of the action of the complex drug of fibrin-specific streptokinase in arterial thrombosis *in vivo* / I. E. Adzerikho [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2019. – Vol. 40, suppl. 1. – Art. P743. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz747.0346>
13. Экспериментальное изучение физико-химических, фармакокинетических свойств и степени безопасности комплексного препарата стрептокиназы на основе фибрин-специфичных липосом / И. Л. Лутик [и др.] // Кардиология в Беларуси. – 2019. – Т. 11, № 5. – С. 729–743.
14. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
15. Compton, S. J. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay / S. J. Compton, G. G. Jones // *Anal. Biochem.* – 1985. – Vol. 151, N 2. – P. 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
16. Сапожников, А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника: руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич. – Смоленск: Смолен. ассоц. ученых, 2000. – 475 с.

References

1. Roth G. A., Johnson C., Abajobir A., Abd-Allah F., Abera S. F., Abyu G. [et al.]. Global Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017, vol. 70, no. 1, pp. 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>
2. van Domburg R. T., Sonnenschein K., Nieuwlaat R., Kamp O., Storm C. J., Bax J. J., Simoons M. L. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005, vol. 46, no. 1, pp. 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.047>
3. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods in Molecular Biology*, 2017, vol. 1522, pp. 17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2
4. Koudelka S., Mikulik R., Mašek J., Raška M., Turánek Knotigová P., Miller A. D., Turánek J. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators. *Journal of Controlled Release*, 2016, vol. 227, pp. 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.019>
5. Dubatovka E. I., Lutik I. L., Chernyavskii E. A., Bondarenko E. S., Adzerikho I. E., Agabekov V. E. Preparation of complex formulations based on liposomal streptokinase and their pharmacokinetic characteristics. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 6, pp. 50–57 (in Russian).
6. Adzerikho I. E., Vladimirskaia T. E., Lutsik I. L., Dubatouka K. I., Agabekov V. E., Branovitskaia E. S., Chernyavsky E. A., Lugovska N. Fibrin-specific liposomes as a potential method of delivery of the thrombolytic preparation streptokinase. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2022, vol. 53, no. 2, pp. 313–320. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02614-0>
7. Adzerikho I., Vladimirskaia T., Lutsik I., Dubatovka K., Agabekov V. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the vivo experiment. *Drug Delivery and Translational Research*, 2023, vol. 13, no. 3, pp. 811–821. <https://doi.org/10.1007/S13346-022-01242-2>
8. Ma Y.-H., Liu Ch.-H., Liang Y., Chen J.-P., Wu T. Targeted Delivery of Plasminogen Activators for Thrombolytic Therapy: An Integrative Evaluation. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 18, art. 3407. <https://doi.org/10.3390/molecules24183407>
9. Pawlowski C. L., Li W., Sun M., Ravichandran K., Hickman D., Kos C., Kaur G., Sen Gupta A., Dreussi E., Toffoli G. Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis. *Biomaterials*, 2017, vol. 128, pp. 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.012>
10. Giodini L., Re F. L., Campagnol D., Marangon E., Posocco B. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue. *Nanomedicine*, 2017, vol. 13, no. 2, pp. 583–599. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.07.012>
11. Li W., McIntyre T. M., Silverstein R. L. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox Biology*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.001>
12. Adzerikho I. E., Lutsik I. L., Vladimirskaia T. E., Cherniavsky E. A. The efficacy and the safety of the action of the complex drug of fibrin-specific streptokinase in arterial thrombosis *in vivo*. *European Heart Journal*, 2019, vol. 40, suppl. 1, art. P743. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz747.0346>
13. Lutik I. L., Vladimirskaia T. E., Chernyavskii E. A., Dubatovka E. I., Adzerikho I. E. Experimental study of physico-chemical, pharmacokinetic properties, and the degree of safety of complex preparation of streptokinase on the base of fibrin-specific liposomes. *Kardiologiia v Belarusi = Cardiology in Belarus*, 2019, vol. 11, no. 5, pp. 729–743 (in Russian).
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
15. Compton S. J., Jones G. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1985, vol. 151, no. 2, pp. 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
16. Sapozhnikov A. G., Dorosevich A. E. *Histological and microscopic techniques*. Smolensk, Smolensk Association of Scientists, 2000. 475 p. (in Russian).

Информация об авторах

Адзерихо Игорь Эдуардович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>. E-mail: adzerikhoigor@mail.ru

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, заведующий отделом. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-7218-3649>. E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by

Владимирская Татьяна Эрнстовна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>. E-mail: tan_2304@inbox.ru

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

Жилкевич Алена Вячеславовна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alenazhilkevich@mail.ru

Information about the authors

Ihar E. Adzerikho – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>. E-mail: adzerikhoigor@mail.ru

Vladimir E. Agabekov – Academician, D. Sc. (Chem.), Professor, Head of the Department. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-7218-3649>. E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by

Tat'yana E. Vladimirskaia – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>. E-mail: tan_2304@inbox.ru

Katsiaryna I. Dubatouka – 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

Aliona V. Zhilkevich – Junior Researcher. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alenazhilkevich@mail.ru