

# МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

## АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

УДК 616.1

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МИОКАРДЕ КРЫС С ОСТРЫМ АРТЕРИАЛЬНЫМ ТРОМБОЗОМ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ТРОМБОЛИЗИСА ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМОЙ ТЕНЕКТЕПЛАЗЫ

**И.Э. Адзериho, Т.Э. Владимирская, А.В. Жилкевич, Д.Л. Михневич**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, alenazhilkevich@mail.ru*

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во всем мире. При этом острый артериальный тромбоз выступает одним из пусковых механизмов развития инфарктов миокарда и головного мозга, а также ишемии нижних конечностей. Разработка систем локальной доставки (Drug Delivery Systems, DDSs) лекарственных средств в определенные органы и ткани позволило повысить эффективность препаратов и минимизировать побочные эффекты. Чтобы улучшить систему доставки тромболитических препаратов к тромбам, были разработаны различные нацеливающие компоненты, включая конформационно-специфические антитела и пептиды. Поскольку основными составляющими тромба являются активированные тромбоциты и фибрин, многие искусственные DDSs основаны на целевой доставке тромболитиков в тромб с использованием тромбоцит-специфических или фибрин-специфических лигандов, что способствует повышению эффективности тромболитической терапии [1,3].

Целью исследования является оценка влияния иммунолипосомальной формы теноктеплазы на эффективность тромболизиса в эксперименте.

**Материалы и методы.** Липосомы получали методом гидратации липидной пленки. Для определения концентрации «свободной» и «связанной» теноктеплазы липосомы ресуспендировали в воде и центрифугировали при 20 000 об./мин в течение 1 часа (Allegra 64R, BeckmanCoulter, США). При этом супернатант содержал «свободную», а осадок – «связанную» теноктеплазу. Гидродинамический диаметр липосом определяли методом динамического рассеяния света, дзета-потенциал измеряли по их электрофоретической подвижности на анализаторе ZetasizerNano ZS (Malvern, Великобритания). Результаты представляют собой средние значения диаметров частиц и их стандартные отклонения пяти независимых измерений образцов. Форму и размеры липосом устанавливали также с помощью, атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Для целевой доставки тромболитического препарата к месту тромбоза были использованы фибрин-специфичные моноклональные антитела (АТ) FnI-3С (класс IgG2a). Модифицированные антителами липосомы готовили непосредственно перед использованием следующим образом: к лиофилизированному порошку липосом с теноктеплазой (Лип(ТНП)) добавляли воду, аккуратно перемешивали без встряхивания, после чего прибавляли раствор конъюгата карбоксиметил-декстрана и АТ (КМД-АТ), перемешивали в течение 10-30 минут для электростатического связывания полисахарида с поверхностью липосом и формирования комплекса. Конечная концентрация липосом в суспензии для инъекций составила 1 мг/мл (по липидам), конъюгата – 0,75 мг/мл.

Все животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой: тромболизис липосомальной формой ТНК (через 2 и 3 часа после моделирования коронарного тромбоза), тромболизис иммунолипосомальной формой ТНК (через 2 и 3 часа после моделирования коронарного тромбоза), контрольная группа - внутривенное введение физиологического раствора. Растворы вводили из расчета 0,5 мг/кг веса животного (коэффициент пересчета доз 6,0). Для потенцирования действия тромболитических препаратов в процессе проведения тромболизиса и профилактики осложнений использовали антикоагулянты (гепарин в дозе 20 тыс. ЕД/сутки в перерасчете на вес животного).

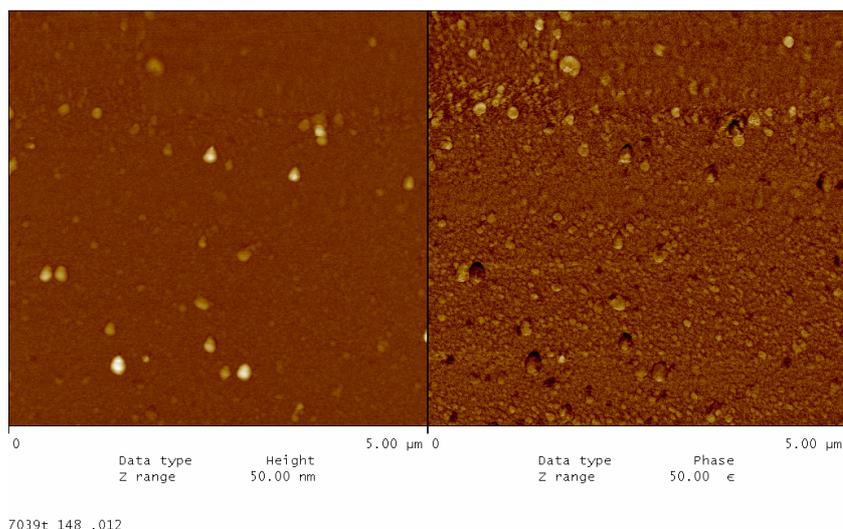
При проведении экспериментальных исследований руководствовались методическими указаниями «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91.М.,1992); ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная

практика»; методическими рекомендациями «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (утв. 16.06.2004 г. ректором БелМАПО). Наркотизацию животных проводили внутримышечным введением раствора кетамина из расчета 0,2-0,3 мл на 100 г веса животного. По истечении срока наблюдения (через 24 ч, 48 ч и 7 сут) животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутрибрюшинного тиопенталового наркоза из расчета 1 мл 5% тиопентала натрия на 100 грамм веса животного.

Для создания модели острого коронарного тромбоза в работе использовали активную реакцию Артюса (феномен Артюса) в стенке кровеносного сосуда [2]: внутрибрюшинное введение лошадиной сыворотки (ЛС) в дозе 0.5 мл/кг с интервалом 5-7 сут между инъекциями – всего 3 раза. Через 5-7 сут после последней инъекции производилось введение тромбина в дозе 5 Ед (0.1 мл) внутривенно и введение разрешающей дозы ЛС в мышцу сердца (0,1 мл).

Для изучения изменений, происходящих в миокарде и коронарных артериях (КА) животных непосредственно после забора крови, извлекали сердца. После фиксации в формалине и стандартной гистотехнической обработки материал заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм на микротоме LeicaRM2265 (Германия, 2008г.) которые окрашивали гематоксилин-эозином, MSB для определения «возраста» фибрина, ГОФП для исследования ранних ишемических повреждений миокарда. Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводилось с помощью световых микроскопов с программным обеспечением («Leica», Германия; Motic China Group Co., Китай).

**Результаты и обсуждение.** Связывание конъюгата КМД-АТ с поверхностью липосом с тенекеплазой привело к увеличению размера везикул по сравнению с Лип(ТНП) до 20-40 нм по высоте и 90-250 нм в диаметре (рисунок 1).

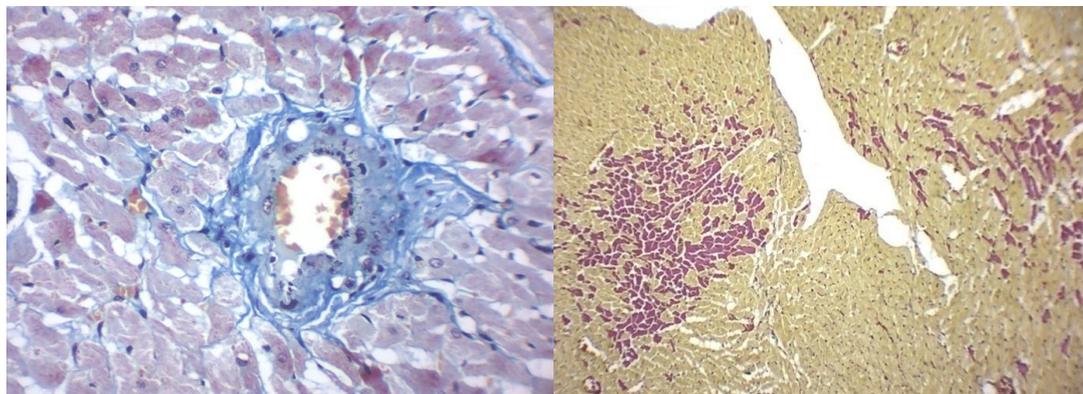


7039t\_148\_.012  
**Рисунок 1. – АСМ-изображение липосом с тенекеплазой, модифицированных антителами (Лип(ТНП)/КМД-АТ): слева – распределение липосом по высоте, справа – в режиме трения. Окно 5x5 мкм**

При добавлении к липосомам с тенекеплазой карбоксиметилдекстрана или его конъюгата с антителами к фибрину происходит модификация поверхности с образованием устойчивых комплексов Лип(ТНП)/КМД и Лип(ТНП)/КМД-АТ. Модификация липосом конъюгатом КМД-АТ не приводила к изменению активности тромболитика.

При морфологическом исследовании миокарда крыс с коронарным тромбозом после лечения липосомальной формой тенекеплазы у всех экспериментальных животных отмечается тромболизис. Введение липосомальной формы тенекеплазы после моделирования тромбоза вызывает тромболизис в КА крупного и среднего калибров всех экспериментальных животных. Фибрин в тромбах зрелый, располагается пристеночно или в следовых количествах, отмечаются следы старого фибрина в коронарных артериях (рисунок 2А). Таким образом, при лечении липосомальной формой тенекеплазы у всех экспериментальных животных отмечается тромболизис в крупных, средних и мелких ветвях КА. В 76% наблюдений в тромбах визуализируются следовые количества старого и зрелого фибрина, в 9% фибрин старый и зрелый, располагающийся пристеночно и в центре, в 15% наблюдений фибрин отсутствует.

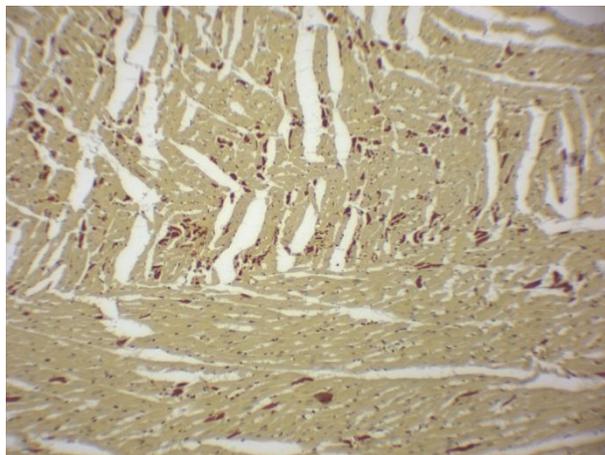
У всех животных при введении лекарственного средства и при всех сроках выведения из эксперимента наблюдаются участки ишемической дистрофии миокарда, мелкие локусы ишемического некроза миокарда, встречаются участки мелкоочагового диффузного кардиосклероза (рисунок 2Б). При окраске на ранние ишемические повреждения миокарда визуализируются субсегментарные и сегментарные контрактуры кардиомиоцитов (КМЦ) ишемического генеза.



**А** **Б**  
**Рисунок 2. – Патоморфологические изменения в миокарде крыс после лечения липосомальной тенектеплазой. Следовой зрелый фибрин в КА. Окраска MSB, ×400 (А). Очаги фуксинофилии КМЦ. Окраска ГОФП,×100 (Б)**

При морфологическом исследовании миокарда крыс с коронарным тромбозом после лечения иммунолипосомальной формой тенектеплазы у всех экспериментальных животных отмечается тромболизис. Фибрин в тромбах в 73% случаев старый в следовых количествах, зрелый располагается чаще пристеночно. Не отмечаются тромбы в сосудах микроциркуляторного русла.

У животных при введении лекарственного средства после моделирования коронарного тромбоза, наблюдаются участки ишемической дистрофии миокарда, мелкие локусы ишемического некроза миокарда (рисунок 3). Встречаются участки мелкоочагового диффузного кардиосклероза и макрофагальная реакция. В большинстве случаев при окраске на ранние ишемические повреждения миокарда фуксинофильный субстрат в миокарде не определяется, ранние ишемические повреждения отсутствуют.



**Рисунок 3. – Контрактуры КМЦ. Окраска ГОФП, ×100**

Таким образом, анализ патогистологической картины миокарда животных с коронарным тромбозом, показывает преимущество лечения коронарного тромбоза в эксперименте у крыс иммунолипосомальной формой тенектеплазы по сравнению с липосомальной формой лекарственного средства. Добавление конъюгата карбоксилированного декстрана и моноклональных антител FnI-3С (класс IgG2) придает липосомам фибрин-специфичные свойства, что подтверждается селективным накоплением фибринолитика на участках тромба и интимы сосуда, содержащих фибрин. Использование иммунолипосомальной формы доставки тканевых активаторов плазминогена может являться эффективным методом лечения острого инфаркта миокарда, способствуя полному

восстановлению просвета коронарных артерий и сосудов микроциркуляторного русла, уменьшению объема пораженного миокарда с отсутствием риска ретромбоза и реинфаркта.

#### **Список использованных источников**

1. Павликова Е.П., Терещенко С.Н., Караваева И.П., Моисеев В.С. Тромболитическая терапия острого инфаркта миокарда у больных пожилого и старческого возраста: ближайший и отдаленный прогноз // Кардиология. – 2002. -№4.-С. 14-18.
2. Шалимов, А.П. Радзиховский, Л.В. Кейсевич Руководство по экспериментальной хирургии. – Москва «Медицина», 1989. – 144 с.
3. Huang, T Recent strategies on targeted delivery of thrombolytics / T.Huang, N. Li, J. Gao // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol.14, Issue 3. – pp. 233-247.