

БИОАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRYУДК 616.12-009.7-005.6+616.127-005.8-036.11]-085-092
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-3-222-234>Поступила в редакцию 10.04.2024
Received 10.04.2024**В. Е. Агабеков¹, И. Э. Адзериho², Т. Э. Владимирская², Е. И. Дубатовка¹,
А. В. Жилкевич², И. Л. Лутик²**¹Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь**ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ АЛТЕПЛАЗЫ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРОМБОЛИЗИСА В КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ
ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА**

Аннотация. Разработана липосомальная (Лип) форма доставки тканевого активатора плазминогена алтеплазы (АлТ). Изучен количественный и качественный состав липосом, их физико-химические характеристики и протеолитическая активность липосомальной формы тромболитика. Установлено, что состав липосом с соотношением фосфатидилхолин / холестерин 1,5 : 1 и липиды / алтеплаза 1 : 1 является оптимальным для лечения острого инфаркта миокарда (ОИМ) в эксперименте. При различных соотношениях компонентов липосомы имели отрицательное значение дзета-потенциала > 30 мВ, что указывает на их агрегативную устойчивость, в том числе и после хранения в течение 2 суток при 20 °С. Липосомы, полученные из соевого фосфатидилхолина, обладают большей коллоидной устойчивостью (значение дзета-потенциала ~ -57 мВ) и имеют меньшее значение гидродинамического диаметра (~ 140 нм) по сравнению с липосомами из яичного фосфатидилхолина ($\sim -35,4$ мВ и ~ 220 нм соответственно). Исходное содержание «свободной» АлТ липосом в супернатанте из яичного фосфатидилхолина Лип_я(АлТ) составило $15,0 \pm 4,0$ %, в течение периода инкубации (4 суток) концентрация АлТ уменьшается до $9,0 \pm 4,5$ %. В случае липосом из соевого фосфатидилхолина Лип_с(АлТ) содержание АлТ в течение периода инкубации увеличивается от $11,0 \pm 4,5$ до $32,5 \pm 6,0$ %. Значения протеолитических активностей тканевого активатора плазминогена в составе Лип_я(АлТ) и Лип_с(АлТ) зависят от типа фосфатидилхолина. Исходная активность АлТ в Лип_я(АлТ) составила 36,0 % и через 1 сутки она увеличилась до 45 %, активность АлТ в Лип_с(АлТ) составила 61,0 %, и через 1 сутки увеличилась до 66,0 %. При использовании липосомальной формы доставки алтеплазы в коронарных артериях крыс с ОИМ отмечается более полный лизис фибрина, в отличие от животных, получающих нативную форму препарата. Разработанная система адресной доставки алтеплазы на основе соевых липосом позволяет ($p < 0,05$) увеличить более чем на 15 % степень восстановления просвета коронарной артерии по сравнению с действием обычного препарата.

Ключевые слова: липосомы, гидродинамический диаметр, дзета-потенциал, протеолитическая активность, острый инфаркт миокарда, алтеплаза, тромболитизис

Для цитирования: Влияние липосомальной формы алтеплазы на эффективность тромболитизиса в коронарных артериях при остром инфаркте миокарда / В. Е. Агабеков, И. Э. Адзериho [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2024. – Т. 60, № 3. – С. 222–234. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-3-222-234>

V. E. Agabekov¹, I. E. Adzerikho², T. E. Vladimirskaya², K. I. Dubatouka¹, A. V. Zhilkevich², I. L. Lutsik²¹*Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*²*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus***THE EFFECT OF THE LIPOSOMAL FORM OF ALTEPLASE ON THE EFFECTIVENESS OF
THROMBOLYSIS IN CORONARY ARTERIES IN ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION**

Abstract. A liposomal (Lip) formulation of tissue plasminogen activator, alteplase (AIT), has been developed. The quantitative and qualitative composition of the liposomes, as well as their physicochemical properties and proteolytic activity, have been studied in relation to the thrombolytic liposomal form. It was determined that a formulation consisting of liposomes with a phosphatidylcholine/cholesterol ratio of 1.5 : 1, and lipids/alteplase ratio of 1 : 1, is optimal for treating acute myocardial infarction (AMI) in experimental models. At different component ratios, liposomes had a negative zeta potential value greater than 30 mV, indicating their aggregative stability, even after storage for two days at 20 degrees Celsius. Liposomes derived

from soy phosphatidylcholine showed greater colloidal stability with a zeta potential of approximately -57 mV and a lower hydrodynamic diameter of approximately 140 nanometers, compared to liposomes derived from egg phosphatidylcholine, which had a zeta potential around -35.4 mV and a hydrodynamic diameter around 220 nanometers. The initial content of free AIT in the liposome supernatant from egg phosphatidylcholine (Lip_{eg}) was 15.0 ± 4.0 %. During the incubation period of 4 days, the concentration of free AIT decreased to 9.0 ± 4.5 %. In contrast, in liposomes derived from soy phosphatidylcholine (Lip_s), the content of free AIT increased from 11.0 ± 4.5 % to 32.5 ± 6.0 % over the same incubation period. The value of the proteolytic activity of tissue plasminogen activator (tPA) in the compositions of Lip_{eg} (AIT) and Lip_s (AIT) depends on the type of phosphatidylcholine. The initial tPA activity in Lip_{eg} (AIT) was 36.0 %, and after 1 day, it increased to 45 %. In Lip_s (AIT), the initial activity was 61.0 % and increased to 66 % after 1 day. When using the liposomal form of alteplase for delivery into the coronary arteries of rats with acute myocardial infarction (AMI), a more complete fibrin lysis is noted compared to animals receiving the native form of the drug. The developed system of targeted delivery of alteplase using soy liposomes has been shown to significantly improve the degree of coronary artery lumen restoration by more than 15 %, compared to the use of a conventional drug ($p < 0.05$).

Keywords: liposomes, hydrodynamic diameter, zeta potential, proteolytic activity, acute myocardial infarction, alteplase, thrombolysis

For citation: Agabekov V. E., Adzerikho I. E., Vladimirskaia T. E., Dubatouka K. I., Zhilkevich A. V., Lutsik I. L. The effect of the liposomal form of alteplase on the effectiveness of thrombolysis in coronary arteries in acute myocardial infarction. *Vestsi Natsyional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 3, pp. 222–234 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-3-222-234>

Введение. Весьма важной при практическом применении является способность липосом 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 липосомы, защищено бислоем липидов от действия неблагоприятных факторов. Одним из перспективных направлений повышения медикаментозного тромболитического является использование липосом нагруженных тромболитическим препаратом, выбор которого зависит от ряда факторов, включающих побочные эффекты, время полувыведения, специфичность к фибрину и иммуногенность. Липосома в данном случае выполняет роль контейнера, из которого препарат высвобождается постепенно, в нужных дозах и в течение требуемого промежутка времени [1, 2].

Одним из таких тромболитиков, который воздействует только на плазминоген, связанный с тромбом, и обладает низкой иммуногенностью и невысокой фибрин-специфичностью, является алтеплаза – активатор плазминогена второго поколения [3]. Его практическое применение позволяет уменьшить дозировку препарата за счет целевой доставки, поэтому данный тромболитик, несмотря на высокую стоимость, применяется для лечения острого инфаркта миокарда [4].

Для липосомальных форм важное значение имеют такие характеристики, как их стабильность в кровотоке, «невидимость» для иммунной системы, адресная доставка препарата в активной форме к месту тромбоза, что регулируется составом липосом и способом их получения.

Для получения липосомальных форм тромболитиков чаще всего используют смесь фосфатидилхолинов, которые формируют бислоюнную мембрану, и холестерина (ХС), который способствует образованию жесткой оболочки, что предотвращает «вытекание» целевого вещества из везикул и их агрегацию.

Наиболее распространенным методом получения липосом с белками является метод гидратации липидной пленки. Для формирования везикул таким способом смесь липидов в хлороформе выпаривают на роторном испарителе до формирования тонкой пленки на стенках колбы, после чего добавляют воду, буфер или раствор биологически активного вещества, перемешивают и лиофилизируют [5, 6].

Выбор липидного состава, типа активатора плазминогена (ТАП) и способа получения его липосомальной формы зависит от ожидаемого эффекта. При разработке средств целевой доставки ТАП, т. е. получении фибрин-специфичных липосом, оптимальным является использование таких тромболитиков, как алтеплаза, тенектеплаза, стафилокиназа, так как они имеют сродство к фибрину, связываются преимущественно с плазминогеном тромба и при этом неиммуногенны. По этой причине в последнее время широко проводятся работы, направленные на получение липосом с различным соотношением липидов и тромболитиков в «свободной» и «связанной» формах, а также изучение их физико-химических свойств [7–11].

В связи с этим в качестве ТАП для получения его липосомальной формы нами выбран фибрин-специфичный тромболитик – алтеплаза.

Эффективность тромболиза для восстановления кровотока в артериальных сосудах с помощью липосом, содержащих лекарственное вещество, зависит не только от их качественного и количественного состава, но и от активности тромболитика.

Цель настоящего исследования – разработать систему доставки липосомальной формы АлТ и установить ее влияние на эффективность тромболиза в коронарных артериях при остром инфаркте миокарда.

Материалы и методы исследования. Липосомы получали методом гидратации липидной пленки [8, 12]: смесь яичного или соевого фосфатидилхолина (ФХ) и холестерина в хлороформе в мольном соотношении 1,5 : 1 упаривали на водяной бане (37 °С), используя роторный испаритель, до образования тонкой пленки липидов на стенках колбы с последующим досушиванием в течение 1 ч под вакуумом до полного удаления растворителя. Затем пленку гидратировали дистиллированной водой, перемешивали и подвергали ультразвуковому воздействию с частотой 35 кГц в течение 10 мин, полученный золь лиофилизировали. После этого добавляли тканевой активатор плазминогена – активное вещество – алтеплаза («Актилизе», Берингер Ингельхайм, Германия) в соотношениях липиды : АлТ 1 : 1, 1,5 : 1, 2 : 1, перемешивали, проводили 5 циклов замораживания-оттаивания (от –20 °С до +37 °С) и лиофилизировали, предварительно добавив криопротектор D-маннитол, для защиты липидной мембраны и предотвращения инактивации препарата в процессе высушивания.

Для включения в состав полученных липосом АлТ были выбраны следующие композиции: ФХ (соевый и яичный) : ХС с содержанием ХС от 33 до 40 %. Для каждого из вариантов получали липосомы с соотношениями липиды : АлТ – 1 : 1, 1,5 : 1, 2 : 1. Активатор плазминогена добавляли к пустым лиофилизированным липосомам и проводили процедуру замораживания-оттаивания (5 раз, –20 °С – +55 °С) для увеличения доли включения активного компонента в везикулы, после чего снова лиофилизировали. Полученные порошки использовали для изучения свойств липосом с АлТ.

Эффективность включения (ЭВ) и содержание АлТ в липосомах определяли стандартным биохимическим методом Бредфорда [13, 14], основанном на связывании белком анионной формы красителя Кумасси G-250 [15]. Для проведения анализа к 700 мкл раствора, содержащего АлТ, прибавляли 300 мкл раствора Кумасси, выдерживали 5 мин и регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм на спектрофлуориметре Solar CM2203 (Беларусь). Калибровочную кривую зависимости оптической плотности D_{595} от концентрации белка $C_{\text{АлТ}}$ строили в диапазоне концентраций АлТ от 7,5 до 400 мкг/мл. Для определения содержания АлТ в липосомах образцы центрифугировали при 20 000 об/мин в течение 1 ч (Allegra 64R, Beckman Coulter, США), после чего супернатант отбирали для анализа. Степень загрузки (СЗ) и ЭВ АлТ в липосомы рассчитывали по формулам:

$$\text{ЭВ}_{\text{АлТ}} = C_{\text{АлТ}_\text{л}} \times 100 \% / C_{\text{ТАП}_\text{исх}},$$

где $\text{ЭВ}_{\text{АлТ}}$ – эффективность включения АлТ, %; $C_{\text{АлТ}_\text{л}}$ – концентрация АлТ в липосомах, мг/мл; $C_{\text{АлТ}_\text{исх}}$ – концентрация АлТ в исходной смеси, мг/мл;

$$\text{СЗ}_{\text{АлТ}} = m_{\text{АлТ}} \times 100 \% / m_{\text{л}},$$

где $\text{СЗ}_{\text{АлТ}}$ – степень загрузки АлТ в липосомы, %; $m_{\text{ТАП}}$ – масса включенного АлТ, мг; $m_{\text{л}}$ – масса липосом, мг.

Высвобождение АлТ из липосом проводили в воде при 37 °С в течение 96 ч.

Определение протеолитической активности тромболитиков осуществляли методом гидролиза белка казеина препаратом фермента с последующим осаждением негидролизованного белка трихлоруксусной или сульфосалициловой кислотами [16]. Для определения протеолитической активности АлТ лиофилизированные образцы липосом из соевого (Лип_с(АлТ)) или яичного (Лип_я(АлТ)) фосфатидилхолина ресуспендировали в воде. В кювету добавляли Трис-буфер (0,1 моль/л, рН 8,4) и инкубировали на водяной бане в течение 5 мин при 37 °С, затем приливали

равный объем образца, содержащего АлТ, добавляли 10 мМ водного раствора хромогенного субстрата (S-2288, Chromogenix) [17–19], представляющего собой трипептид, от которого в присутствии активатора плазминогена отщепляется *p*-нитроанилин. Регистрировали спектры поглощения при $\lambda = 405$ нм. Диапазон рабочих концентраций и активность АлТ в липосомах определяли из графиков зависимостей «степень поглощения (A) – время реакции (t)» для растворов с различной концентрацией тромболитика и «скорость $\Delta A/\text{ч}$ – концентрация (C)» за первые 5 мин реакции:

$$\text{Активность } A \sim V_0 (\Delta A/\text{ч})$$

Определение протеолитической активности АлТ в липосомах показало, что оптимальной концентрацией исходного золь Лип(АлТ) является 1 мг/мл, поскольку значения $\Delta A/\text{ч}$ попадают в калибровочную кривую 0,25 – 1,00 мг/мл. Учитывая, что активности АлТ не являются абсолютными величинами, то для сравнительной оценки различных типов липосомальных форм тромболитика находили долю от номинальной активности по формуле:

$$X = A(\text{АлТ}) \times 100 \% / A(\text{АлТ}_T),$$

где X – доля от номинальной (теоретической) активности АлТ, %; $A(\text{АлТ})$ – активность АлТ в липосомах с концентрацией 1 мг/мл; $A(\text{АлТ}_T)$ – активность раствора АлТ с концентрацией 1 мг/мл.

При определении концентрации «свободного» и «связанного» тромболитика липосомы ресуспендировали в воде и центрифугировали при 20 000 об/мин в течение 1 ч (Allegra 64R, Beckman Coulter, США). При этом супернатант содержал «свободную», а осадок – «связанную» АлТ [11, 15].

Для визуализации липосом использовали флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS/олеиламин (ФНЧ), которые вводили в липосомы на стадии формирования липидной пленки при соотношении липиды : ФНЧ 500 : 1 (мас.). Спектры флуоресценции липосом регистрировали на спектрофлуориметре (микроскоп Planar100-МБ, Беларусь) при увеличении 400 раз.

Гидродинамический диаметр липосом определяли методом динамического рассеяния света, дзета-потенциал измеряли по их электрофоретической подвижности на анализаторе Zetasizer Nano 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 просвечивающей электронной (ПЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Экспериментальные животные. Исследования *in vivo* проводили на 50 беспородных самцах крыс весом 200–350 г в соответствии с соблюдением принципов биоэтики, методическими указаниями «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91. М., 1992), ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика».

Наркотизацию животных проводили внутримышечным введением раствора кетамина из расчета 0,2–0,3 мл на 100 г веса животного. По истечении срока наблюдения животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (по стандартам GLP) на фоне внутривенного тиопенталового наркоза из расчета 1 мл 5%-го тиопентала натрия на 100 г веса животного.

Моделирование тромба и формирование групп. Для создания модели ОИМ использовали активную реакцию Артюса (феномен Артюса) в стенке кровеносного сосуда [20]: внутривенная иммунизация лошадиной сывороткой в дозе 0,5 мл/кг массы тела с интервалом 5–7 суток между инъекциями – всего 3 раза, через 5–7 суток после последней инъекции введение 0,1–0,15 мл сыворотки в мышцу сердца.

Все животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа – крысы с ОИМ без лечения; 2-я группа – внутривенное введение физиологического раствора животным с ОИМ; 3-я группа – тромболитический нативной АлТ; 4-я группа – тромболитический липосомальной формой АлТ. Все формы АлТ вводили из расчета 0,5 мг/кг массы тела животного через 2 ч после моделирования ОИМ. Для потенцирования действия тромболитических препаратов в процессе проведения тромболитического и профилактики осложнений использовали внутривенное введение гепарина в дозе 20 тыс. ЕД/кг массы тела животного.

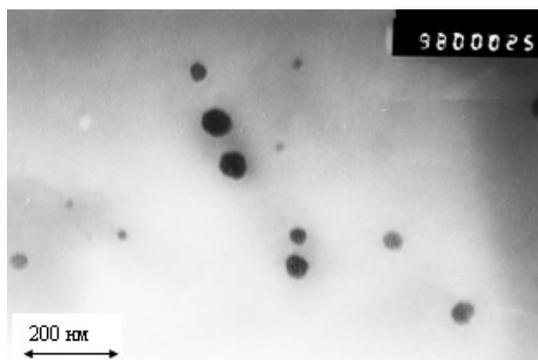


Рис. 1. ПЭМ-изображение липосом (увеличение в 72 тыс. раз)

Fig. 1. TEM image of the liposomes (magnification of 72 thousand times)

Период наблюдения за животными составил 180 мин. По истечении срока наблюдения животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутривенного тиопенталового наркоза.

Гистологические исследования. Для проведения гистопатологических исследований у животных извлекали сердца и рассекали на поперечные пластины. После фиксации в формалине и стандартной гистотехнической обработки материал заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм (микротом Leica RM2265, Германия), которые окрашивали гематоксилин-эозином, MSB для определения «возраста» фибрина.

Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводились с помощью светового микроскопа с программным обеспечением (Leica, Германия).

Морфометрические исследования проводили при помощи программ количественной микроскопии для анализа и обработки изображений Leica-Qwin версии 1.56. Определяли площади тромба (A1) и просвета сосуда (A2), степень тромбозиса рассчитывали по формуле:

$$A2/A1+A2.$$

Результаты и их обсуждение. Разработка липосомальной системы доставки АлТ. По результатам ПЭМ получаемые липосомы имели сферическую форму и размеры 30–70 нм (рис. 1).

При добавлении воды к лиофильно высушенным смесям во всех случаях получали опалесцирующую суспензию из липосом. Их гидродинамический диаметр зависел от типа использованного ФХ и соотношения ФХ : ХС (табл. 1).

Таблица 1. Гидродинамический диаметр, дзета-потенциал и индекс полидисперсности липосом при различных соотношениях компонентов

Table 1. Hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity index of liposomes at different component ratios

Состав липосом, ФХ : ХС	Соотношение компонентов, мол. (содержание ХС, %)	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности (PDI)	Дзета-потенциал, мВ
ФХ (соевый)	2 : 1 (33 %)	80–100 270 (2 сут)	0,44	–52,3 –42,8 (2 сут)
	1,5 : 1 (40 %)	60–200 70–100 (2 сут)	0,32	–42,7 –34,3 (2 сут)
	1 : 1 (50 %)	220 300–520 (2 сут)	0,35	–45,9 –36,4 (2 сут)
ФХ (яичный)	2 : 1 (33 %)	40–50 40–60 (2 сут)	0,46	–37,0 –34,0 (2 сут)
	1,5 : 1 (40 %)	40–50 60–70 (2 сут)	0,43	–32,0 –31,0 (2 сут)
	1 : 1 (50 %)	30–40 40–50 (2 сут)	0,47	–34,0 –33,0 (2 сут)

Образование липосом с наименьшими размерами (30–50 нм) характерно при использовании яичного ФХ, в то время как из соевого лецитина размер везикул зависел от содержания ХС: с увеличением его количества от 33 до 50 % гидродинамический диаметр изменялся от 60 до 220 нм (табл. 2).

Величина и знак дзета-потенциала являются одними из важнейших параметров стабильности коллоидных растворов и скорости клиренса частиц в крови [10, 21]. Чем выше его величина,

Таблица 2. Гидродинамический диаметр, дзета-потенциал и индекс полидисперсности липосом с АлТ при различных соотношениях компонентов

Table 2. Hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity index of liposomes with АлТ at different component ratios

Состав липосом, соотношение ФХ : ХС	Соотношение липиды : ТАП, мас.	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности (PDI)	Дзета-потенциал, мВ
ФХ (соевый) : ХС 2 : 1	2 : 1 (33 %)	30–70	0,61	
	1,5 : 1 (43 %)	35–45	0,54	–57,0
	1 : 1 (50 %)	40–60	0,56	–59,4
ФХ (соевый) : ХС 1,5 : 1	2 : 1 (33 %)	80–100	0,33	–55,2
	1,5 : 1 (43 %)	55–65	0,58	–52,4
	1 : 1 (50 %)	65–75	0,53	–49,2
ФХ (соевый) : ХС 1 : 1	2 : 1 (33 %)	60–75	0,66	–50,3
	1,5 : 1 (43 %)	55–80	0,47	–51,2
	1 : 1 (50 %)	65–75	0,65	–44,7
ФХ (яичный) : ХС 2 : 1	2 : 1 (33 %)	80–90	0,61	–20,4
	1,5 : 1 (43 %)	95–105	0,48	–40,2
	1 : 1 (50 %)	90–105	0,55	–48,9
ФХ (яичный) : ХС 1,5 : 1	2 : 1 (33 %)	80–90	0,46	–31,2
	1,5 : 1 (43 %)	85–105	0,56	–37,8
	1 : 1 (50 %)	95–105	0,54	–45,4

тем больше силы отталкивания, препятствующие агрегации липосом. Исследованные образцы отрицательно заряжены, значения дзета-потенциала во всех случаях имели величину > 30 мВ, что указывало на их агрегативную устойчивость, в том числе и после хранения в течение 2 суток при 20 °С. Липосомы, полученные из соевого ФХ, показали наименьшие значения дзета-потенциала: от -52 до -43 мВ, в то время как из яичного ФХ – от -37 до -32 мВ.

В случае липосом из соевого лецитина с содержанием ХС 33 % размеры Лип_с(АлТ) составили 30–70 нм, что меньше, чем в случае не нагруженных белком липосом. При этом значение дзета-потенциала также уменьшилось до -59 мВ, что указывает на стабилизацию липосомальных композиций при включении АлТ (табл. 2).

Увеличение количества ХС в липосомах до 40–50 % приводило к незначительному увеличению гидродинамического диаметра липосом, который составлял 55–100 нм с одновременным уменьшением значения дзета-потенциала до -45 мВ. При использовании яичного лецитина размеры липосом составили 80–105 нм, их дзета-потенциал уменьшался от -20 до -49 мВ при увеличении количества АлТ до соотношения 1 : 1.

Для защиты липидной мембраны и предотвращения инактивации препарата в процессе высушивания добавляли криопротектор D-маннитол к Лип (ТАП).

В присутствии D-маннитола увеличение содержания ХС в липосомах приводило к агрегации липосом и увеличению их гидродинамического диаметра от 75 до 470 нм (табл. 3).

При этом значение дзета-потенциала изменялось незначительно и оставалось в пределах от $-58,1$ до $-46,5$ мВ, что указывало на коллоидную устойчивость системы. Поскольку липосомы склонны к агрегации, они имели достаточно широкое распределение по размерам: значения индекса полидисперсности PDI находились в пределах 0,45–0,92 в зависимости от состава.

Выход липосомальной формы АлТ зависел главным образом от ее содержания: увеличение количества алтеплазы приводило к уменьшению выхода от $\sim 97,0$ % для Лип(ТАП) – 33 % до $\sim 76,5$ % в случае Лип(ТАП) – 50 %. Основные потери веществ приходились на стадию лиофилизации.

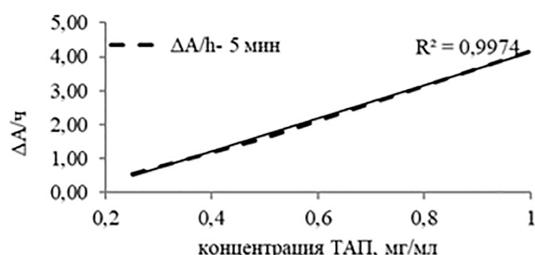
Предварительно были установлены оптимальные условия определения активности АлТ: концентрация и количество добавляемого хромогенного субстрата (ХрС), диапазон определяемых концентраций АлТ, время и температура реакции.

Реакцию гидролиза ХрС проводили при 37 °С в термостатируемой ячейке при постоянном перемешивании растворов и смеси.

Таблица 3. Гидродинамический диаметр, дзета-потенциал, индекс полидисперсности и выход липосом с АлТ при различных соотношениях компонентов в присутствии D-маннитола

Table 3. Hydrodynamic diameter, zeta potential, polydispersity index and yield of liposomes with AIT at different component ratios in the presence of D-mannitol

Состав липосом, соотношение ФХ : ХС	Соотношение липиды : ТАП, мас.	Выход липосом, %	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности (PDI)	Дзета-потенциал, мВ
ФХ (соевый) : ХС 2 : 1	2 : 1 (33 %)	96,9	130–140	0,92	–54,7
	1,5 : 1 (43 %)	91,1	75–85	0,55	–47,8
	1 : 1 (50 %)	80,0	85–95	0,71	–46,5
ФХ (соевый) : ХС 1,5 : 1	2 : 1 (33 %)	82,3	60–80	0,90	–56,9
	1,5 : 1 (43 %)	80,0	280–310	0,85	–55,4
	1 : 1 (50 %)	81,9	120–140	0,45	–56,6
ФХ (соевый) : ХС 1 : 1	2 : 1 (33 %)	81,2	400–450	0,79	–51,7
	1,5 : 1 (43 %)	83,0	450–470	0,63	–56,0
	1 : 1 (50 %)	76,4	320–370	0,88	–58,1
ФХ (яичный) : ХС 2 : 1	2 : 1 (33 %)	85,2	140–165	0,45	–45,8
	1,5 : 1 (43 %)	80,6	155–190	0,68	–49,4
	1 : 1 (50 %)	78,1	200–240	0,63	–50,1
ФХ (яичный) : ХС 1,5 : 1	2 : 1 (33 %)	88,7	160–185	0,64	–46,2
	1,5 : 1 (43 %)	92,1	180–225	0,71	–45,3
	1 : 1 (50 %)	96,2	220–240	0,56	–48,4

Рис. 2. Зависимость скорости реакции ($\Delta A/h$) от концентрации АлТ при температуре 37 °СFig. 2. Dependence of the reaction rate ($\Delta A/h$) on AIT concentration at a temperature of 37 °С

Скорости реакций ($\Delta A/h$) АлТ с ХрС в течение первых 10 мин линейно увеличивали при концентрации АлТ от 0,25 мг/мл до 1,0 мг/мл и составляли 0,5 и 4,1 $г^{-1}$ соответственно (рис. 2). Увеличение времени реакции до 30 мин для растворов с концентрациями 0,5 и 1 мг/мл приводило к замедлению накопления п-нитроанилина.

В связи с этим при определении активности АлТ рабочий диапазон концентраций составлял 0,25–1,00 мг/мл при времени проведения реакции 5 мин (коэффициент корреляции $0,997 \pm 0,002$), что в дальнейшем было использовано для построения калибровочной кривой с целью определения соответствующей концентрации тканевого активатора плазминогена.

Увеличение количества добавляемой АлТ к липидам от 33 до 50 % во всех случаях приводило к увеличению эффективности ее включения и степени загрузки в липосомы. Наименьшие значения ЭВ характерны для липосом с соотношением липидов 2 : 1 в случае соевого 75,5 % и для яичного 72,7 % ФХ. Наибольшая эффективность включения, равная 85,8–89,2 %, характерна для образцов, содержащих в исходной смеси 43–50 % АлТ и при соотношении ФХ : ХС 1,5 : 1 (рис. 3).

С увеличением количества добавленной к липосомам АлТ возрастала и их степень загрузки от ~ 26,0 до 47,0 %.

Дальнейшее увеличение концентрации АлТ для включения в липосомы приводило к незначительному изменению степени загрузки и эффективности включения, а также уменьшению выхода конечного продукта, поэтому состав липосом ФХ : ХС – 1,5 : 1 и соотношение липиды : АлТ – 1 : 1 являются оптимальными для дальнейшего его использования (рис. 3).

Липосомы Лип_с(АлТ) и Лип_я(АлТ) на планарной поверхности имели округлую форму диаметром до 60 нм и высоту ~ 7,0 нм (рис. 4).

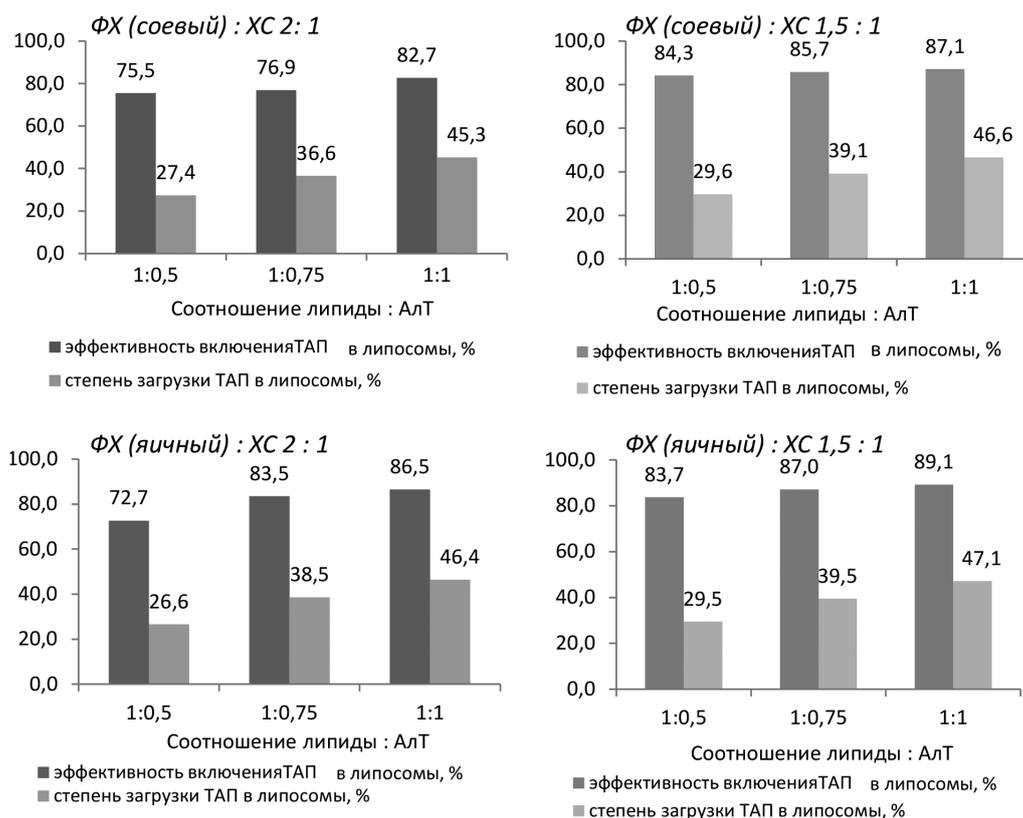


Рис. 3. Сравнительная характеристика эффективности включения и степени загрузки АлТ в липосомы в зависимости от их состава и соотношения компонентов

Fig. 3. Comparative characteristics of the inclusion efficiency and the degree of loading of ALT into liposomes depending on their composition and ratio of components

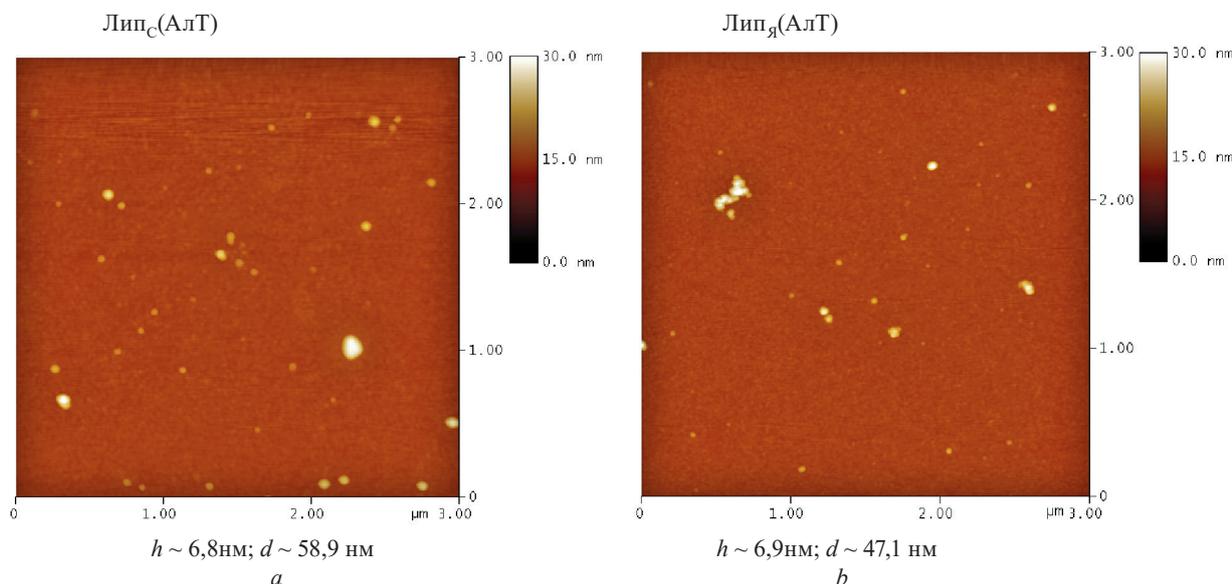


Рис. 4. АСМ-изображение липосом из ФХ с АлТ соевого (а) и яичного (b); h – высота липосом, d – их диаметр

Fig. 4. AFM image of liposomes from PC with ALT from soy (a) and egg (b); h – height of liposomes, d – their diameter

При различных соотношениях компонентов липосомы имели отрицательное значение дзета-потенциала, что связано с наличием на их поверхности как фосфоэфирных групп, так и отрицательно заряженных групп тромболитика. Липосомы из соевого фосфатидилхолина Лип_с(АлТ) обладали большей коллоидной устойчивостью (значение дзета-потенциала ~ -57 мВ) и имели

меньшее значение гидродинамического диаметра (~ 140 нм) по сравнению с Лип_я(АлТ), что может быть обусловлено более жесткой и менее текучей мембраной Лип_с, благодаря чему они слабее агрегировали (табл. 4).

Таблица 4. Характеристики липосом с АлТ

Table 4. Characteristics of liposomes with АIT

Характеристика липосом	Лип _я (АлТ)	Лип _с (АлТ)
Гидродинамический диаметр, нм	220–240	120–140
Дзета-потенциал, мВ	-35,4 ± 0,9	-56,6 ± 1,5
Эффективность включения АлТ в липосомы, %	89,0 ± 7,5	87,0 ± 7,0
Содержание АлТ в липосомах, %	46,5 ± 2,5	47,0 ± 4,5
Общая активность после приготовления липосом, % от номинальной	36,0 ± 2,5	61,0 ± 7,0
Общая активность через 1 сутки после приготовления липосом, % от номинальной (изменение активности)	45,5 ± 4,0	66,0 ± 8,0

Для применения липосом в тромболитической терапии важно, чтобы при их разведении раствором для инъекций они сохраняли свою целостность, отсутствовало существенное высвобождение активного вещества, а также поддерживалась его активность до введения в кровоток. Поскольку при разрушении липосом возможен выход тканевого активатора плазминогена в раствор как в активной, так и неактивной форме, то высвобождение АлТ из липосом в воде при температуре 37 °С в течение 96 ч определяли в супернатанте, полученном после центрифугирования образцов [10, 21].

Исходное содержание «свободной» АлТ в супернатанте Лип_я(АлТ) составило 15,0 ± 4,0 %. Уменьшение концентрации активатора плазминогена в течение периода инкубации (4 суток) до 9,0 ± 4,5 %, вероятно, связано с реадсорбцией высвобождающегося белка на липидной мембране и осаждением при центрифугировании. В случае липосом из соевого ФХ содержание АлТ за 24 ч увеличилось от 11,0 ± 4,5 до 22,0 ± 4,5 % и до 32,5 ± 6,0 % в течение 96 ч, т. е. выход тканевого активатора плазминогена составил ~ 11,0 и 22,0 % за 1 и 4 суток соответственно. При этом за первый час высвобождалось незначительное количество тромболитика, что указывает на стабильность липосом в растворе и возможность их хранения и использования после приготовления суспензии без существенной потери активного вещества.

Активность тромболитического препарата в составе липосом является одним из основных параметров для их дальнейшего применения в экспериментах *in vivo*.

Значения протеолитических активностей тканевого активатора плазминогена в составе Лип_я(АлТ) и Лип_с(АлТ) зависят от типа фосфатидилхолина (см. табл. 4). Активность АлТ в липосомах из яичного ФХ составила 36,0 % и через 1 сутки она увеличилась на ~ 10 %. В случае использования соевого ФХ исходное значение активности АлТ было выше и составило 61,0 %, а через 24 ч увеличилось до 66,0 %. Это свидетельствует как о высвобождении тромболитика из липосом, так и сохранении его активности в течение 24 ч. При этом препарат, по-видимому, находится внутри липосом, в бислое липидов, на их поверхности и в свободном состоянии в золе. Поскольку детектировать АлТ внутри контейнеров не представляется возможным, то реальная активность Лип(АлТ) при достижении тромба может быть выше за счет прикрепления липосом и высвобождения вещества.

Результаты гистологического исследования сердца крыс в группе с моделью ОИМ с использованием иммунологических реакций. У крыс с моделью ОИМ отмечали артериальные тромбы – обтурирующие (27 %), субобтурирующие (52 %), пристеночные (21 %). У одной крысы наблюдался спонтанный минимальный тромбозис: в пристеночной части тромба прослеживался очаг разрыхления эритроцитов. Спектр окрашивания фибрина методом MSB включал оттенки ярко-красного и серо-голубого цветов.

Неравномерная окраска миокарда в препаратах экспериментальных животных, выведенных через час после моделирования ОИМ, свидетельствовала о наличии субсегментарных поврежденных кардиомиоцитов. Наблюдали волнистую деформацию, субсегментарные и сегментарные повреждения и некроз кардиомиоцитов. Отмечали диффузно-очаговое выраженное венозно-капил-

лярное полнокровие, в капиллярах – агрегацию эритроцитов, нарастание полной блокады капиллярного кровотока. На фоне повреждения внутренней выстилки сосудов и нарушения реологических свойств крови тромбы развивались не только в крупных ветвях коронарных артерий, но и в сосудах микроциркуляторного русла.

Оценка эффективности тромболитика по данным гистологического исследования. В коронарных артериях крыс после введения физиологического раствора наблюдали обтурирующие и субобтурирующие красные тромбы с полями фибрина, плотно спаянные с внутренней выстилкой артерий без признаков тромболитика (рис. 5, а).

При лечении АлТ у всех экспериментальных животных отмечали тромболитиз в крупных и средних ветвях коронарных артерий, в сосудах микроциркуляторного русла наблюдали агрегацию эритроцитов, остановку капиллярного кровотока. По результатам окрашивания MSB в тромбах визуализировали старый и зрелый фибрин, располагающийся пристеночно и в центре (рис. 5, б).

При морфологическом исследовании миокарда крыс с ОИМ после лечения Лип(АлТ) у всех экспериментальных животных наблюдается тромболитиз. Практически полный фибринолиз в крупных и средних коронарных артериях, в просвете мелких коронарных артериях фибрин визуализируется в следовых количествах (рис. 5, с). В сосудах микроциркуляторного русла сохранялись очаги агрегации эритроцитов. В большинстве случаев в тромбах наблюдаются следовые количества старого и зрелого фибрина, а в отдельных коронарных артериях фибрин отсутствовал.

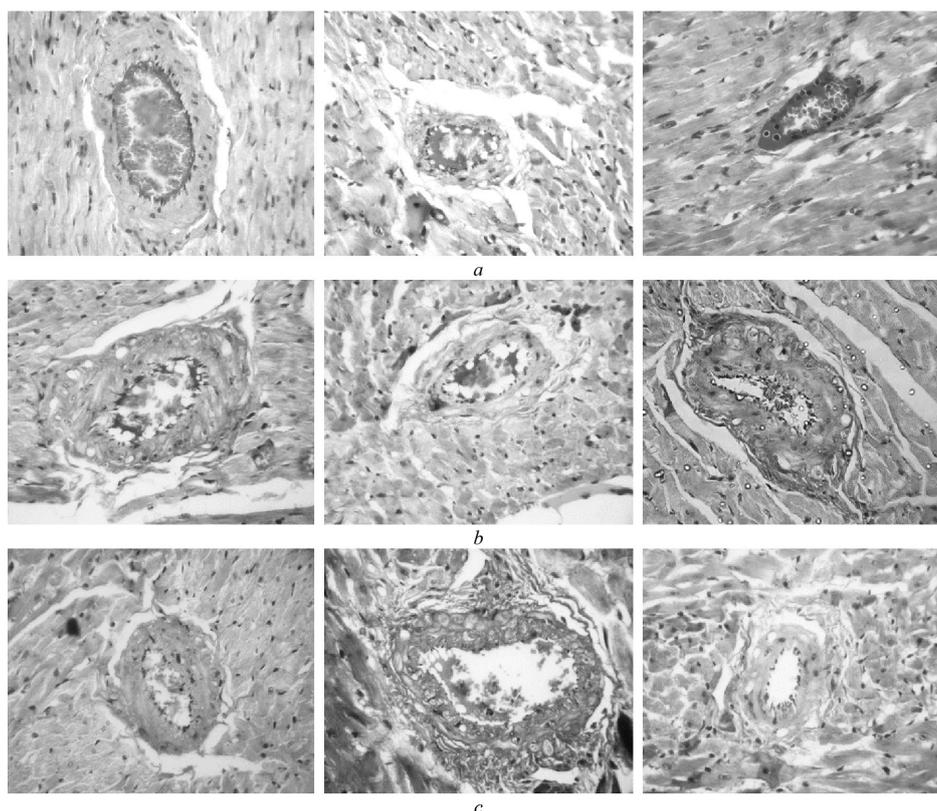


Рис. 5. Патоморфологические изменения в коронарных артериях крыс с индуцированными тромбами. Репрезентативные изображения коронарных артерий, окрашенных MSB, введение физиологического раствора (а), тромболитиз АлТ (б), ЛипАлТ (с)

Fig. 5. Pathomorphological changes in the coronary arteries of rats with induced thrombi. Representative images of coronary artery coronary arteries stained with MSB, saline injection (a), ALT thrombolysis (b), Li-pALT (c)

Во всех экспериментальных группах наблюдали тромболитиз, степень которого значительно ($p < 0,05$) увеличилась при использовании липосомальной формы доставки тромболитика ($76,35 \pm 5,5 \%$) по сравнению с обычной формой ($63,8 \pm 1,5 \%$). Таким образом, разработанная

система адресной доставки алтеплазы на основе соевых липосом позволяет достоверно увеличить ($p < 0,05$) степень восстановления просвета коронарной артерии по сравнению с действием обычного препарата.

Заключение. Разработана липосомальная форма целевой адресной доставки тканевого активатора плазминогена алтеплазы, полученная методом гидратации липидной пленки из смеси ФХ (соевого, яичного) и ХС (1,5 : 1) с добавлением в качестве криопротектора D-маннитола и соотношением липиды : алтеплаза 1 : 1, с выходом ~ 82–96 %.

Установлено, что Лип_с(АлТ) по сравнению с Лип_я(АлТ) обладают большей коллоидной устойчивостью (значение дзета-потенциала ~ –57 против ~ –35 мВ), более высокой протеолитической активностью (~ 61 против ~ 36 %) и имеют меньшее значение гидродинамического диаметра (~ 140 против ~ 240 нм).

Липосомальная форма доставки тромболитика вызывает наиболее полный фибринолизис в коронарных артериях крыс по сравнению с его обычной формой, что подтверждается увеличением более чем на 15 % степени восстановления просвета сосуда ($p < 0,05$).

Полученные результаты создают основу для разработки улучшенной формы тромболитических препаратов, а именно системы адресной доставки. Для этого необходимо получить и исследовать свойства сложных конъюгатов, состоящих из липосом с включенным тромболитиком и векторов для направленного транспорта, в частности антител к компонентам тромба.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов 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.).

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 “Fundamental and Applied Sciences in Medicine” (2019–2021).

Список использованных источников

1. Тараховский, Ю. С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ / Ю. С. Тараховский. – М.: Изд-во ЛКИ, 2011. – 280 с.
2. Advanced drug delivery systems for antithrombotic agents / C. F. Greineder [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122, № 9. – P. 1565–1575. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-453498>
3. Nanomedicine as a strategy to fight thrombotic diseases / M. Varna [et al.] // *Future Sci. OA*. – 2015. – Vol. 1, № 4. – FSO46. <https://doi.org/10.4155/fso.15.46>
4. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators / S. Koudelka [et al.] // *J. Controlled Release*. – 2016. – Vol. 227, № 10. – P. 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.019>
5. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies / B. Maherani [et al.] // *Curr. Nanosci.* – 2011. – Vol. 7, iss. 3. – P. 436–452. <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>
6. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? / D. J. A. Crommelin [et al.] // *J. Controlled Release*. – 2020. – Vol. 318. – P. 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>
7. Перспективы применения в клинической практике наноразмерных форм лекарственных препаратов / Ю. М. Краснопольский [и др.] // *Рос. хим. журн.* – 2012. – Т. 56, № 3–4. – С. 11–33. <https://doi.org/10.1134/s1070363213120517>
8. 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.
9. 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.
10. Development and characterization of site specific target sensitive liposomes for the delivery of thrombolytic agents / B. Vaidya [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2011. – Vol. 403, № 1–2. – P. 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.028>
11. Fibrin-specific liposomes as a potential method of delivery of the thrombolytic preparation streptokinase / I. E. Adzerikho [et al.] // *J. Thromb. Thrombolysis*. – 2022. – Т. 53, № 2. – С. 313–320. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02614-0>
12. Влияние липосомальной формы стрептокиназы на образование Д-димеров / Е. И. Дубатовка [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 54–58.
13. 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, № 1–2. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
14. 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, № 2. – P. 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
15. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the in vivo experiment / I. E. Adzerikho [et al.] // *Drug Deliv. Transl. Res.* – 2023. – Т. 13, № 3. – С. 811–821. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01242-2>

16. The preparation of human fibrinolysin (plasmin) / J. T. Sgouris [et al.] // *Vox. Sang.* – 1960. – Vol. 5, № 4. – P. 357–376. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1960.tb03750.x>
17. Temperature-sensitive liposome-mediated delivery of thrombolytic agents / V. Saxena [et al.] // *Int. J. Hypertherm.* – 2015. – Vol. 31, № 1. – P. 67–73. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.991428>
18. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator / J.-Y. Kim [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30, № 29. – P. 5751–5756. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.021>
19. Wang Y. J., Pearlman R. *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs. Pharmaceutical biotechnology* / Y. J. Wang, R. Pearlman. – New York; London: Plenum press, 1993. – 353 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1236-7>
20. Шалимов, С. А. Руководство по экспериментальной хирургии / С. А. Шалимов, А. П. Радзиховский, Л. В. Кейсевич. – М.: Медицина, 1989. – 144 с.
21. Thrombus-targeted nanocarrier attenuates bleeding complications associated with conventional thrombolytic therapy / S. Absar [et al.] // *Pharm. Res.*, 2013. – Vol. 30. – P. 1663–1676. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1011-x>

References

1. Tarakhovsky Yu. S. *Intelligent lipid nanocontainers in targeted drug delivery*. Moscow, Publishing house LKI, 2011. 280 p. (in Russian).
2. Greineder C. F., Howard M. D., Carnemolla R., Cines D., Muzykantov V. Advanced drug delivery systems for anti-thrombotic agents. *Blood*, 2013, vol. 122, no. 9, pp. 1565–1575. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-453498>
3. Varna M., Juenet M., Bayles R., Mazighi M., Chauvierre C., Letourneur D. Nanomedicine as a strategy to fight thrombotic diseases. *Future Science OA*, 2015, vol. 1, no. 4. <https://doi.org/10.4155/fso.15.46>
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, no. 10, pp. 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.019>
5. Maherani B., Arab-Tehrany E., Mozafari M. R., Gaiani C., Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*, 2011, vol. 7, iss. 3, pp. 436–452. <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>
6. Crommelin D. J. A., Hoogevest P., Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? *Journal of Controlled Release*, 2020, vol. 318, pp. 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.023>
7. Krasnopolsky Yu. M., Balabanyan V. Yu., Shobolov D. L., Shvets V. I. Prospective clinical applications of nanosized drugs. *Russian Journal of General Chemistry*, 2013, vol. 83, pp. 2524–2540. <https://doi.org/10.1134/s1070363213120517>
8. Dubatouka K. I., Lutsik I. L., Cherniavsky 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).
9. Lutik I. L., Vladimirskaya T. E., Chernyavsky E. A., Dubatouka E. I., Adzerikho I. E. Experimental study of the physicochemical, pharmacokinetic properties and degree of safety of a complex preparation of streptokinase based on fibrin-specific liposomes. *Cardiology in Belarus*, 2019, vol. 11, no. 5, pp. 729–743 (in Russian).
10. Vaidya B., Nayak M. K., Dash D., Agrawal G. P., Vyas S. P. Development and characterization of site specific target sensitive liposomes for the delivery of thrombolytic agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, vol. 403, no. 1–2, pp. 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.028>
11. Adzerikho I. E., Vladimirskaya T. E., Lutsik I. L., Dubatouka K. I., Agabekov V. E., Branovitskaya 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>
12. Dubatouka K. I., Agabekov V. E., Lutsik I. L., Yatsевич 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).
13. 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, no. 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
14. 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)
15. Adzerikho I., Vladimirskaya T., Lutsik I., Dubatouka K., Agabekov V. Efficiency of targeted delivery of streptokinase based on fibrin-specific liposomes in the in vivo experiment. *Drug Delivery and Translational Research*, 2023, vol. 13, iss. 3, pp. 811–821. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01242-2>
16. Sgouris J. T., Inman J. K., McCall K. B., Hyndman L. A., Anderson H. D. The preparation of human fibrinolysin (plasmin). *Vox Sanguinis*, 1960, vol. 5, no. 4, pp. 357–376. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1960.tb03750.x>
17. Saxena V., Johnson C. G., Negussie A. H., Karun V. S., Dreher M. R., Wood B. J. Temperature-sensitive liposome-mediated delivery of thrombolytic agents. *International Journal of Hyperthermia*, 2015, vol. 31, no. 1, pp. 67–73. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.991428>
18. Kim J.-Y., Kim J.-K., Park J.-S., Byun Y., Kim C.-K. Biomaterials The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, no. 29, pp. 5751–5756. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.021>
19. Wang Y. J., Pearlman R. *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs. Pharmaceutical biotechnology*. New York; London, Plenum press Publ, 1993. 353 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1236-7>

20. Shalimov S. A., Radzihovskij A. P., Kejsevich L. V. *Manual of experimental surgery*. Moscow, Meditsina Publ., 1989. 144 p. (in Russian).

21. Absar S., Nahar K., Y. Kwon M., Ahsan F. Thrombus-targeted nanocarrier attenuates bleeding complications associated with conventional thrombolytic therapy. *Pharmaceutical Research*, 2013, vol. 30, pp. 1663–1676. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1011-x>

Информация об авторах

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

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

Владимирская Татьяна Эрнстовна – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, Минск, Республика Беларусь). ORCID id: <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>. E-mail: tan_2304@inbox.ru

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

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

Лутик Ирина Леонидовна – младший научный сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lutik-irinka@yandex.by

Information about the author

Agabekov Vladimir E. – Academician, D. Sc. (Chemistry), 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). ORCID id: <https://orcid.org/0000-0002-7218-3649>. E-mail: agabekov@ichnm.basnet.by

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

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

Dubatouka Katsiaryna I. – 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

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

Lutik Iryna L. – Junior Researcher. Belarusian State Medical University (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lutik-irinka@yandex.by