

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В КОМПЛЕКСЕ С ЛИПИДНЫМИ НАНОСТРУКТУРАМИ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

З. А. Суслина¹, Д. И. Прохоров¹, А. Г. Шилова², А. П. Каплун²,
В. Г. Ионова¹, Р. Д. Сейфулла¹

Изучено влияние липидных нанокомплексов, загруженных ацетилсалициловой кислотой, на агрегацию тромбоцитов *in vitro*. В составе липосом из гликофинголипидов головного мозга свиньи антиагрегантное действие аспирина не только достоверно выше, чем в контроле, но и сопровождается нивелированием развития проагрегантных эффектов. Показано, что АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов сокращается при введении электростатического заряда в структуру липидного бислоя липосом. При этом максимальный эффект обнаружен при использовании липосом, обладающих отрицательным зарядом, по сравнению с положительно заряженными липосомами.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, ацетилсалициловая кислота (аспирин), липосомы, гликофинголипиды, тромбообразование, инсульт

ВВЕДЕНИЕ

К важнейшим проблемам современной медицины причисляют различные тромбоэмболические явления, возникающие при избыточной активности тромбоцитов (Тц). Суммируя данные литературы, посвященные патогенезу цереброваскулярных заболеваний, можно сказать, что ведущая роль в развитии патологических процессов в артериальной системе, таких как тромбообразование, атерогенез, ишемические заболевания сердца и головного мозга, принадлежит активации кровяных пластинок [5]. Этот факт стал научно обоснованной базой для применения антиагрегантных препаратов для лечения и профилактики ишемических нарушений кровообращения у больных в кардиологических и ангионеврологических клиниках [6].

Для регулирования процесса агрегации Тц уже создано большое количество лекарственных препаратов. К сожалению, почти все широко используемые препараты оказывают неблагоприятные побочные воздействия. Так, важной клинической проблемой применения ацетилсалициловой кислоты (АСК) в медицинской практике как антиагрегантного средства является резистентность у значительной доли пациентов к терапии АСК (аспиринорезистентность), а также повышение риска кровотечений, особенно у пожилых пациентов, развития диспепсических расстройств и эрозивно-язвенного гастрита [4].

¹ Лаборатория клинической фармакокинетики (зав. – проф. Р. Д. Сейфулла), лаборатория гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой (зав. – проф. В. Г. Ионова) НЦН РАМН, Москва, 125367, Волоколамское ш., 80.

² Кафедра биотехнологии и бионанотехнологии (зав. – акад. РАМН В. И. Швец) Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (технологический университет), Москва

Соответственно, получение новых форм антиагрегантов, обладающих высокой биологической активностью, востребовано большим числом пациентов, которые нуждаются в их длительном приеме (в течение многих лет) без ощутимых побочных эффектов.

Проведенные ранее исследования показали способность липосом особого состава (на основе гликофосфолипидов, ГСфЛ) оказывать ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов человека [2, 7 – 10]. Таким образом, сочетание эффекта антиагрегантного лекарственного препарата, АСК, и собственной антиагрегантной способности липосом представляется перспективным для использования в терапии состояний, сопровождающихся повышенной агрегацией тромбоцитов. В связи с этим целью настоящей работы является разработка и оптимизация методики загрузки липосом АСК с последующей оценкой влияния их на агрегацию Тц человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходным сырьем для выделения ГСфЛ служил головной мозг свиньи. Фрагменты мозговой ткани массой 10 – 15 г гомогенизировали на льду. Выделение ГСфЛ из гомогената производили следующим образом: 1) обезвоживание гомогената холодным ацетоном, экстракция нейтральных липидов; 2) удаление остаточной части нейтральных липидов второй ацетонной экстракцией; 3) экстракция фосфолипидов этиловым спиртом при температуре до 35 °С; 4) экстракция ГСфЛ спиртом при температуре до 65 °С; 5) кристаллизация ГСфЛ из спиртового раствора [1].

Исследование состава сырья проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. Хроматографию проводили в системе растворителей хлороформ:метанол:вода (65:25:4). Количественный и качественный состав полученного кристаллического продукта представлен в таблице.

Получение липосом из смеси гликофинголипидов. К 500 мкл раствора АСК концентрацией 1 мг/мл добавляли 340 мкл 1% дисперсии ГСФЛ и доводили физиологическим раствором до 1 мл. Затем нагревали в течение 30 мин при 60 °С и диспергировали, используя ультразвуковую баню, в течение 3 мин. Липосомы без АСК получали аналогично, используя вместо раствора АСК физиологический раствор.

Получение заряженных липосом. В круглодонную колбу объемом 10 мл помещали 10 мг холестерилсукцината и 90 мг соевого фосфатидилхолина (сФХ). Раствор липидов в хлороформе упаривали на роторном испарителе при 40 °С до постоянной массы. К полученной липидной плёнке добавляли 1 мл дистиллированной воды и инкубировали при 4 °С в течение 4 ч. Затем диспергировали, используя ультразвуковую баню в течение 3 мин и продавливали через ядерные поликарбонатные фильтры (“Whatman”, США) с диаметром пор 200 нм 17 раз [11]. Липосомы из смеси холестерилпиридиний бромиды и сФХ получали аналогичным образом.

Определение степени включения ацетилсалициловой кислоты в липосомы. Концентрацию АСК в липосомах и степень включения в них вещества рассчитывали по данным измерения оптической плотности при 271 нм после добавления к 2 мл фракции, содержащей липосомы, и к фракции, содержащей не включившуюся АСК, по 0,08 мл 5,4% раствора дезоксихолата натрия.

Липосомы отделяли от низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией на колонке NAP-5 (“Amersham Biosciences”, США) или на колонке с сефадексом G-75 (“Pharmacia”, Швеция).

Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови пациентов с хронической цереброваскулярной патологией. Влияние на агрегацию Тц липосом различного состава исследовали на лазерном агрегометре Viola (Россия) [3] в лаборатории гемореологии и нейроиммунологии с клинической лабораторной диагностикой НЦН РАМН.

Приготовление образцов богатой тромбоцитами плазмы (PRP). Образцы PRP получали из образцов крови пациентов с артериальной гипертензией (АГ), с различными по степени выраженности атеросклеротического поражения магистральных артерий головы (МАГ) и клиническими признаками хронической цереброваскулярной патологии (ХЦВЗ). Объем одного образца крови вместе с антикоагулянтом составлял

15 мл. Кровь отбирали в полипропиленовую пробирку, содержащую 1,5 мл 3,8 % цитрата натрия (рН 7.4), соотношение крови донора и антикоагулянта 9:1. Пробирку с кровью центрифугировали при 900–1000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге MLW К 70 D (ГДР). Полученную плазму, обогащенную тромбоцитами, отбирали в чистую полипропиленовую пробирку с крышкой (обычно s от полученного объема), отобрав аликвоту (30–60 мкл для определения исходного количества Тц в плазме крови). Оставшуюся 1/4 часть плазмы отбирали в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 5 мл для последующего получения безтромбоцитарной плазмы (PPP). После измерения исходной концентрации Тц на приборе ABX – MICROS (Австрия) рассчитывали степень разбавления исходной PRP до нормируемой рабочей PRP с концентрацией Тц 200 000 клеток/мкл:

$$\alpha = [\text{Тц}]_{\text{исх}} / 200\,000,$$

где α – степень разбавления исходной PRP.

Для разбавления PRP объемом $V'_{\text{PRP}} = V_{\text{PRP}}^{\text{исх}} / \alpha$ необходимо следующее количество PPP:

$$V_{\text{PPP}} = V_{\text{PRP}}^{\text{исх}} (\alpha - 1),$$

где $V_{\text{PRP}}^{\text{исх}}$ – исходный объем PRP.

Количество PPP, требуемое для разбавления, отбирали из $V_{\text{PRP}}^{\text{исх}}$. PPP получали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге ОП_н-8-У 4.2 (СССР). После центрифугирования весь полученный объем PPP переносили в чистую пробирку, затем добавляли требуемое количество PPP к оставшемуся объему PRP для получения рабочей PRP. 300 мкл PPP расходовали для калибровки прибора.

Метод исследования процесса агрегации тромбоцитов. В канал агрегометра “Биола” (Россия) вставляли кювету с 300 мкл PRP, выдерживали 2 мин, после чего добавляли индуктор агрегации (2 мкл 5 мМ раствора аденозиндифосфата (ADP) в воде или физиологическом растворе) и 10 мкл исследуемой 1% липосомальной дисперсии. Агрегатограмму снимали в течение 14 мин с момента начала инкубации.

Полученные результаты оценивали статистически при помощи пакета статистических программ Statistica 7.0. Для анализа данных были применены Т-критерий для независимых выборок и одномерный факторный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что при воздействии “чистого” препарата АСК АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов (АДФ-АТ) снижалась в среднем на 8,6%, не давая достоверных различий с исходной величиной ($N = 63$; $t = 1,58$, $p > 0,05$). В опытах с введением аспирина в составе липосом на основе

Состав полученного кристаллического продукта

Название компонента	Содержание, %
Цереброзиды (Ц)	45,5 – 46,1
Цереброзид сульфаты (ЦС)	14,2 – 18,9
Фосфатидилхолин (ФХ)	17,4 – 30,2
Фосфатидилэтаноламин (ФЭ)	5,7 – 5,9
Триглицериды (ТГ)	2,3 – 11,2

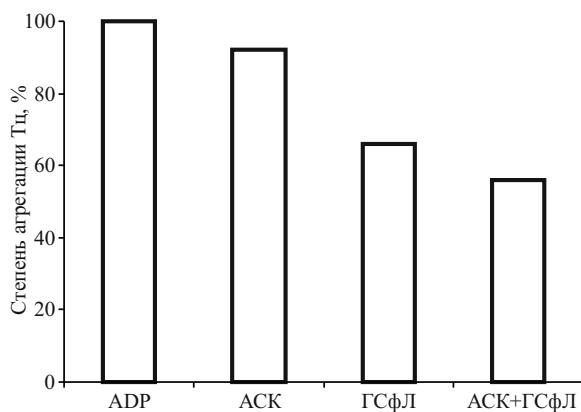


Рис. 1. Изменение ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов при воздействии АСК и липосом, полученных из гликофинголипидов (“пустых” и загруженных АСК).

Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс – форма вводимого препарата, по оси ординат – степень АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, %.

гликофинголипидов снижение АДФ-АТ составило 44,2% при наличии высоко достоверного различия выборок ($N = 62$; $t = 9,35$, $p < 0,01$), рис. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность антиагрегантного действия аспирина в присутствии липосом из сфинголипидов существенно повышалась. Таким образом, выявлено выраженное суммирование антиагрегантного эффекта.

Учитывая наличие индивидуальной чувствительности пациентов к препаратам при оценке воздействия совместного использования АСК и гликофинголипидов, мы применили одномерный факторный анализ. В качестве определяющей переменной использовался характер ответа на введение антиагреганта в сравнении с базовым уровнем АДФ-АТ. В ходе исследования условно было выделено три характерных типа реакции тромбоцитов на действие АСК *in vitro*: проагрегантное действие, отсутствие видимого эффекта, явное антиагрегантное влияние. Анализируя данные совместного воздействия АСК и сфинголипидных везикул, установили существенное снижение разницы в индивидуальных ответах пациентов на действие АСК. Эти данные позволяют констатировать возможность нивелирования развития резистентности тромбоцитов у больных с ЦВЗ к антиагрегантам при введении лекарственных средств в сочетании со сфинголипидными нанокапсулами.

Естественно предположить, что в развитии указанных выше процессов не последняя роль принадлежит присутствию в гликофинголипидных липосомах заряженных липидов. В связи с этим представилось важным проведение исследования характера влияния разноразряженных липидов в составе липосом на АДФ-АТ. Для этого была использована липосомальная дисперсия из смеси холестерилсукцината и сФХ в соотношении 1:9 и липосомальная дисперсия из смеси холестерилпиридиний бромид и сФХ в соотношении 1:9.

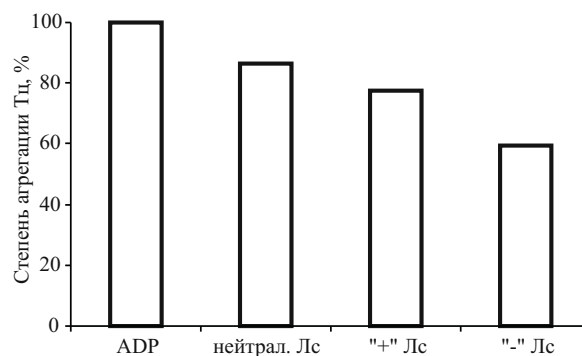


Рис. 2. Влияние липосом (Лс), содержащих в составе заряженные липиды, на агрегацию тромбоцитов.

Установлено, что липосомы, содержащие холестерилпиридиний бромид (положительно заряженный липид), при инкубировании с PRP подавляли агрегацию в среднем на 22,4%, тогда как содержащие холестерилсукцинат (отрицательно заряженный липид) снижали агрегацию почти вдвое - на 40,6% (рис. 2).

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что заряженные липосомы демонстрируют качественно схожее, но различающееся по силе воздействия модифицирующее влияние на динамические свойства Тц.

Представленные результаты открывают новые возможности для разработки путей повышения эффективности АСК, нивелирования негативных побочных эффектов при длительном (пожизненном) использовании ацетилсалициловой кислоты в сочетании с гликофинголипидными липосомами при лечении больных с цереброваскулярными заболеваниями [12].

ВЫВОДЫ

1. При введении *in vitro* ацетилсалициловой кислоты (АСК) в составе липосом на основе гликофинголипидов снижение АДФ-индуцированной агрегации (АДФ-АТ) составило 44,2% в отличие от воздействия “чистого” препарата АСК, где данный параметр снижался в среднем на 8,6%.

2. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов сокращается при введении электростатического заряда в структуру липидного бислоя липосом. Максимальный эффект обнаружен при использовании липосом, обладающих отрицательным зарядом, по сравнению с положительно заряженными липосомами.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 09-04-13852-офи_ц.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Ветрова, А. П. Каплун, Н. А. Михайлова и др., Патент России RU 2274460 (2006).
2. В. И. Закревский, И. А. Рудько, А. А. Кубатиев, *Бюл. экпер. биол.*, **11**(11), 464 – 466 (1992).
3. В. Г. Ионова, З. А. Суслина, Е. Г. Демина, Патент России 2188419 (2000).

4. В. В. Рафальский, А. В. Крикова, А. Н. Багликов, *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*, **8**(7), 1 – 8 (2009).
5. J. F. Mustard, M. A. Packham, *Thromb Diathesis Haemorrhage*, **33**, 444–456 (1975).
6. G. Y. Lip, D. C. Felmeden, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3 (2004).
7. V. Berdichevskii, R. Markosyan, et al., *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **88**, 141 – 143 (1979).
8. Y. Yatomi, F. Ruan, et al., *Blood.*, **86**(1), 193 – 202 (1995).
9. Y. Yatomi, S. Yamamura, et al., *J Biol. Chem.*, **272**(8), 5291 – 5297 (1997).
10. L. Reinish, M. Bally, et al., *Thromb Haemost.*, **60**(3), 518 – 523 (1988).
11. M. Hope, M. Bally, et al., *Biochim Biophys Acta*, **812**, 55 – 65 (1985).
12. C. H. Hennekens, *Am J Manag Care.*, **8**(22), 691 – 700 (2002).

Поступила 10.12.10

EFFECT OF ACETYSALICYLIC ACID IN COMPLEX WITH LIPID NANOSTRUCTURES OF VARIOUS COMPOSITIONS ON HUMAN PLATELET AGGREGATION

Z. A. Suslina¹, D. I. Prokhorov¹, A. G. Shilova², A. P. Kaplun², V. G. Ionova¹, and R. D. Seifulla¹

¹ Laboratory of Clinical Pharmacokinetics, Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Volokolamskoye Shosse 80, Moscow, 125367, Russia

² Department of Biotechnology and Bionanotechnology, Moscow Institute of Fine Chemical Technology (Technical University), Moscow, Russia

The effect of lipid nanocomplexes loaded with acetylsalicylic acid (aspirin) on platelet aggregation *in vitro* was investigated. The antithrombotic effect of aspirin in complex with liposomes prepared from pig brain glycosphingolipids is not only significantly higher compared to control, but also accompanied by leveling of the development of proaggregant effects. It was shown that ADP-induced platelet aggregation is reduced by the introduction of electrostatic charge in the structure of lipid bilayer of liposomes. The effect achieved for the liposomes possessing a negative charge was more pronounced in comparison to the effect of positively charged liposomes.

Key words: Platelet aggregation, acetylsalicylic acid (aspirin), liposomes, glycosphingolipids, thromb formation, stroke