

## ІНГІБУВАННЯ ГЕМОЛІЗУ ПОЛІМЕРАМИ ТА ЛІПОСОМАМИ

*Встановлено, що позитивно або негативно заряджені полімери і полімерні наночастки з великою щільністю заряду проявляють високу антигемолітичну активність в інгібуванні імунного гемолізу. Полімерні фосфатидилхолінові везикули мають меншу  $IC_{50}$ , ніж інтактні полімери без фосфатидилхоліну.*

*Негативно заряджені полімерні наночастки проявляли більшу антигемолітичну активність при меншій концентрації, ніж позитивно заряджені, в інгібуванні неспецифічного гемолізу, викликаного дією сурфактантів. Полімери без ліпосом були малоефективними в інгібуванні неспецифічного гемолізу.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемоліз, ліпосоми, полімери, антигемолітична активність.

**ВСТУП.** Гемоліз відбувається в результаті пошкодження мембрани еритроцитів. Список захворювань, що супроводжуються або викликані гемолізом, великий. До імунних захворювань, спричинених лізисом еритроцитів, належать: 1) гемолітична хвороба немовлят (ГХН), зумовлена імунологічним конфліктом через несумісність крові плода і матері по еритроцитарних антигенах, частіше при несумісності по резус-фактору; 2) пароксизмальна нічна гемоглобінурія. Тяжкі форми ГХН можуть призводити до летального наслідку.

Неспецифічний гемоліз спричиняється дією різних гемолітичних агентів. От неповний перелік захворювань, що супроводжуються або викликані гемолізом:

1. Гострий гемоліз при тропічній малярії.
2. Анаеробні клостридії виділяють ряд екзотоксинів, що спричиняють гемоліз.
3. Гемоліз викликається дією бактеріальних ферментів: гемолізинів – альфа (hemolysin *Staphilococcus aureus*), бета (*Streptococcus agalacta*).
4. Причиною анемії у хворих із хронічною нирковою недостатністю, лікованих гемодіалізом, є гемоліз.
5. Лікарський гемоліз, викликаний дією лік - окиснювачів (амінохіноліни, хінідин, сульфаніламід, нітрофуран, вітамін А, великі дози пеніциліну, цефалоспоринів).

Чи можна запобігти гемолізу або інгібувати його? Відомий білковий препарат (антирезусний імуноглобулін людини) для превентивного лікування вагітних жінок з резус-конфліктом з метою попередження гемолітичної

хвороби новонароджених, але він викликає сильні алергічні реакції, що супроводжуються іноді анафілактичним шоком [2].

Раніше ми показали, що ліпосоми, приготовлені на основі полярних ліпідів, запобігають комплементіндукованому гемолізу [3]. Оскільки зазначені ліпосоми (Лс) мали негативний заряд, припустили, що можна інгібувати гемоліз, використовуючи полімери або полімерні наночастки з негативним зарядом.

Метою даного дослідження було вивчення антигемолітичної активності (АА) різних полімерів, а також негативно і позитивно заряджених полімерних наночасток в імунному комплементзалежному і неспецифічному гемолізі.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі використано: 10 % спиртовий розчин яєчного лецитину, кролячу гемолітичну сироватку, ліофілізований комплемент морської свинки, еритроцити барана (ЗАТ "Біолік", Україна); холестерин, лаурил-сульфат, Dextran, Polyglycine, Poly-L-valine, Polygalacturonic acid, Poly-L-Glutamic acid, Polyadenylic acid, De-N-sulfated Heparin Na-salt, Heparin Na-salt, Poly-L-lysine HBR-salt, Polyethylenimine та Dextran sulfate придбано у фірми "Sigma" (США); Polyacrylic acid і Poly (vinil sulfate, K-salt) – у фірмі "Aldrich" (США).

**Одержання ліпосом.** Лс було отримано з яєчного лецитину або суміші лецитин+ холестерин (ФХ+Хол) у співвідношенні 80:20 %. Лс одержували методом упарювання ліпідів на вакуумному ротаційному упарювачі (Швейцарія). Далі суміш суспендували у фізіологічному розчині й інтенсивно струшували до повного видалення плівки ліпідів зі стінок колби. Кінцева концентрація ліпідів – 1 мг/мл.

Для одержання Лс використовували ультразвукову баню Branson 2210 (США) і прилад Microfluidizer 110Y (Microfluidics Corp., США). Розмір Лс визначали за допомогою спектрометра лазерного кореляційного розсіювання, змонтованого з He-Ne лазера (632,8 нм; Model 127, Lexel Laser, Inc., США), гоніометра BI-200 SH (Brookhaven Instruments Co., США), цифрового корелятора BI-8000 AT (Brookhaven Instruments Co., США) і циркулятора (Neslab RTE-100, США), при 25 °С. Середній розмір Лс складав 100–180 нм. Потім отриману дисперсію розводили фізіологічним розчином до потрібних концентрацій.

#### **Одержання полімерних наночастинок.**

Для отримання полімерних наночастинок використовували яєчний ФХ або суміш ФХ+Хол і полімери у співвідношенні 1:1 полімер:ліпід, тому що більшість обраних полімерів має гнучку структуру, а для додаткової взаємодії з клітинами необхідна тверда структура. Ми вибрали ФХ, оскільки він найбільш поширений природний полярний ліпід.

До 1 % розчину ФХ або суміші ліпідів додавали 1 % розчин полімерів. Потім одержували Лс, як було зазначено вище. Отриману дисперсію розводили фізіологічним розчином до потрібних концентрацій. Проводили контроль за рН ліпосом, що коректували додаванням 1 % розчинів NaOH або HCl до рН=7-8.

**Визначення антигемолітичної активності ліпосом і полімерів в імунному комплементзалежному гемолізі.** Для перевірки антигемолітичної активності отриманих зразків в імунному комплементзалежному гемолізі 1 % дисперсії Лс, що містять ліпід і полімери, додавали до гемолітичної системи, яка складалась з 0,3 % дисперсії еритроцитів барана, антитіл до них (титр 1:1200) і 10 % комплементу морської свинки у рівних обсягах. У контролі (повний гемоліз) додавали замість Лс такий же обсяг фізіологічного розчину. Після інкубування всіх зразків при 37 °С відокремлювали інтактні та зруйновані еритроцити шляхом центрифугування і вимірювали в супернатанті концентрацію гемоглобіну за оптичним поглинанням при 418 нм. AA було обчислено за рівнянням:  $AA = ((OD_c - (OD_{ex} - ODL_{s+P})) / OD_c) \cdot 100 \%$ , де  $OD_{ex}$  – оптична щільність в експерименті;  $OD_c$  – оптична щільність у контролі;  $ODL_{s+P}$  – оптична щільність Лс із полімерами або оптична щільність полімерів, розведена до концентрації в експерименті.

**Визначення антигемолітичної активності ліпосом і полімерів в імунному гемолізі за присутності EDTA.** Визначали, як

описано вище, але в рівних обсягах у пробірці було додано 1 mM розчин EDTA.

**Методи інгібування гемолізу, викликаного дією сурфактантів.** 0,0041 % розчин лаурил-сульфату додавали через 5 хв після інкубування 0,3 % суспензії еритроцитів із 0,02–1 % дисперсіями Лс при 20 °С. Одночасно здійснювали контроль – повний гемоліз еритроцитів: замість Лс додали рівний обсяг фізіологічного розчину. Після одержання повного гемолізу в головному контролі (10 хв) усі зразки центрифугували (3 хв, 3000 об. за хвилину). Супернатант розвели у 8 разів і вимірювали оптичну щільність при 418 нм. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі Beckman DU-68 (Швеція).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Інгібування імунного гемолізу полімерами і ліпосомами з полімерами.** Результати вивчення антигемолітичної активності полімерів і полімерних наночастинок, отриманих на основі яєчного ФХ і полімерів, наведено на рисунку 1. Тільки полімери і полімерні наночастилки зі значними зарядами, як позитивним, так і негативним, проявляли високу антигемолітичну активність (рис. 1, поз. 10–13).

У ході експерименту було встановлено, що Лс із полімерами мають меншу  $IC_{50}$ , ніж полімери без Лс. Ми припустили, що взаємодія полімерів з компонентами гемолітичної системи (комплемента, антитіла, еритроцити) може бути специфічною, неспецифічною (електростатичною) або комбінованою. Треба відзначити, що основний внесок в енергію комплементарних взаємодій роблять гідрофобні взаємодії. Заряди, як видно, в основному правильно орієнтують молекули, що взаємодіють.

**Механізм взаємодії ліпосом і полімерів з гемолітичними агентами.** Ми запропонували, щоб взаємодія негативно заряджених полімерів з білками (комплемента і антитіла) в імунному гемолізі була через  $Ca^{++}$ -міст, перевірили AA Лс в імунному комплементзалежному гемолізі за присутності етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Відомо, що EDTA зв'язують  $Ca^{++}$  у людській сироватці. Ми запропонували: якщо AA негативно заряджених Лс зменшиться за присутності EDTA, а AA позитивно заряджених Лс буде стабільною, то в цьому випадку матимемо взаємодію Лс із білками через  $Ca^{++}$ -міст. Розходження між AA Лс без EDTA і за присутності EDTA не виявлено. Тому наша пропозиція щодо взаємодії Лс і полімерів з комплементом і антитілами через  $Ca^{++}$ -міст не була підтверджена в експериментах з EDTA.

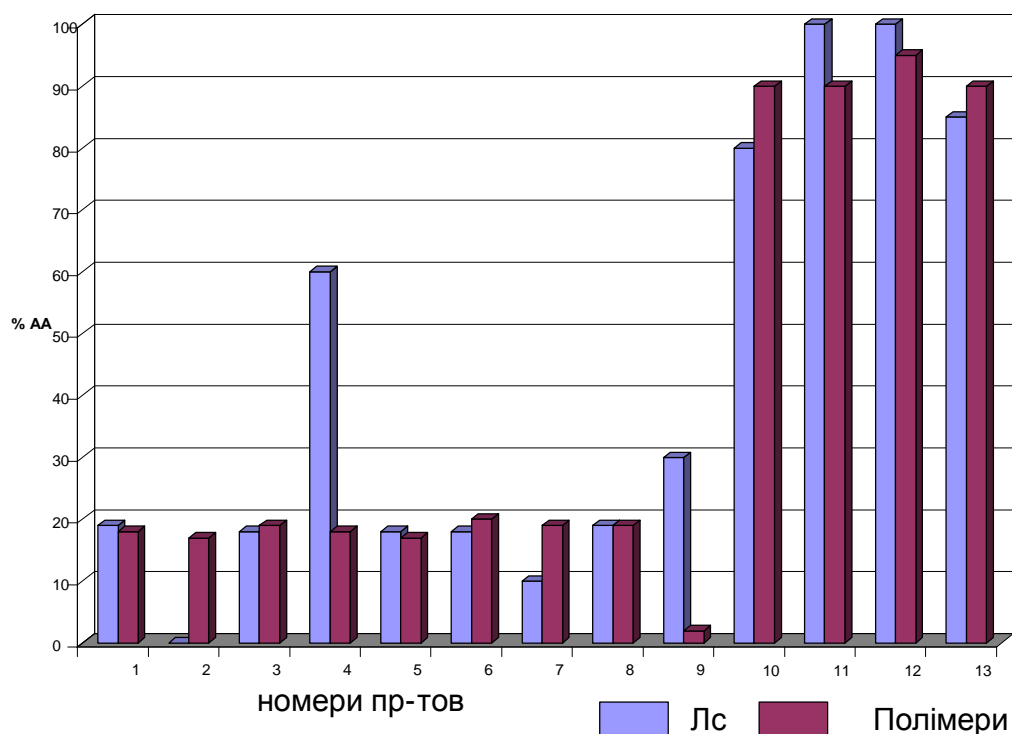


Рис. 1. Антигемолітична активність полімерів та полімерних ліпосом в інгібуванні імунного гемолізу.

Примітка. Незаряджені полімери: 1 – Лс із декстраном та декстран; 2 – Лс із полігліцином та полігліцин; 3 – Лс із поліваліном та полівалін.

Слабозаряджені полімери: 4 – Лс із поліакриловою кислотою та поліакрилова кислота; 5 – Лс із полігалактуроною кислотою та полігалактуронова кислота; 6 – Лс із поліглутаміною кислотою та поліглутамінова кислота; 7 – Лс із поліаденіловою кислотою та поліаденілова кислота; 8 – Лс із сульфатированим гепарином та сульфатирований гепарин; 9 – Лс із гепарину Na-сіллю та гепарину Na-сіль.

Полімери з великою щільністю заряду: 10 – Лс із полілізином та полілізин; 11 – Лс із поліетиленіміном та поліетиленімін; 12 – Лс із сульфатом полівінілу та сульфат полівінілу; 13 – Лс із сульфатом декстрану та сульфатом декстрану.

Після попереднього інкубування полімерних наночасток з компонентами гемолітичної системи встановлено, що негативно заряджені полімерні наночастки взаємодіють з комплементом та інгібують його активність, а позитивно заряджені – взаємодіють з антиеритроцитарними антитілами та інгібують їх активність, тим самим запобігаючи гемолізу.

**Інгібування неспецифічного гемолізу.** На відміну від імунного гемолізу, неспецифічний викликається низькомолекулярними субстанціями. Для того, щоб перешкоджати такому виду гемолізу, досить знайти субстанцію, що має велику спорідненість до руйнівного агента або до продукції його дії: субстанції, які володіють довгими гідрофобними регіонами (ліпосоми або жирові емульсії, або альбумін) [1]; Fe-іон-комплекс [6]; циклодекстрини, що інгібують гемоліз, викликаний адріаміцином [4], хлорпромазин [5]. Через неспецифічну взаємодію інгібування активності руйнівних агентів було невеликим, крім того, була необхідна значна кількість цих субстанцій для запобігання гемолізу.

У даній роботі ми перевірили позитивно і негативно заряджені полімери та полімерні наночастки для запобігання неспецифічному гемолізу, викликаному сурфактантом: лаурилсульфатом.

Для вивчення антигемолітичної активності полімерів у цьому експерименті використовували позитивно і негативно заряджені полімери, що мають значну щільність заряду: поліетиленімін (позитивний заряд) і сульфат декстрану (негативний заряд) (табл.).

Таблиця – Кількість специфічного заряду полімерів

Назва полімеру	Специфічний заряд
Сульфат декстрану	242
Поліетиленімін	43

Результати проведення цього експерименту наведено на рисунку 2. Полімери без Лс мали невелику AA незалежно від їх заряду (рис. 2, лінії 5, 6), полімерні наночастки – значну AA. У цьому випадку, на відміну від імун-

ного гемолізу, мав значення заряд полімерних Лс. Негативно заряджені полімерні Лс на основі ФХ та ФХ+Хол, що містили сульфат декстрану (рис. 2, лінії 2, 4), проявляли вищу (100 %) АА при меншій концентрації, ніж позитивно заряджені Лс, що містили поліетиленімін (рис. 2, лінії 1, 3).  $IC_{50}$  Лс із поліетиленіміном – 0,8 мг/мл, із сульфатом декстрану – 0,2 мг/мл. Додавання холестерину до фосфатидилхоліну практично не впливало на активність Лс (рис. 2, лінії 3, 4).

Таким чином, експерименти щодо інгібування неспецифічного гемолізу показали

можливість створення ліпосомального препарату на основі яєчного лецитину і полімерів.

Основний недолік фосфатидилхолінових ліпосом як лікарської форми – відносно невелика стабільність при збереженні. Цього недоліку позбавлені полімерні наночастки, що мають ті ж галузі можливого застосування. Але, на відміну від ліпосом, полімерні наночастки складаються з менш безпечного матеріалу, ніж ліпіди.

Використання полімерних нановезикул для інгібування гемолізу може мати місце при імплантації кардіопротезів.

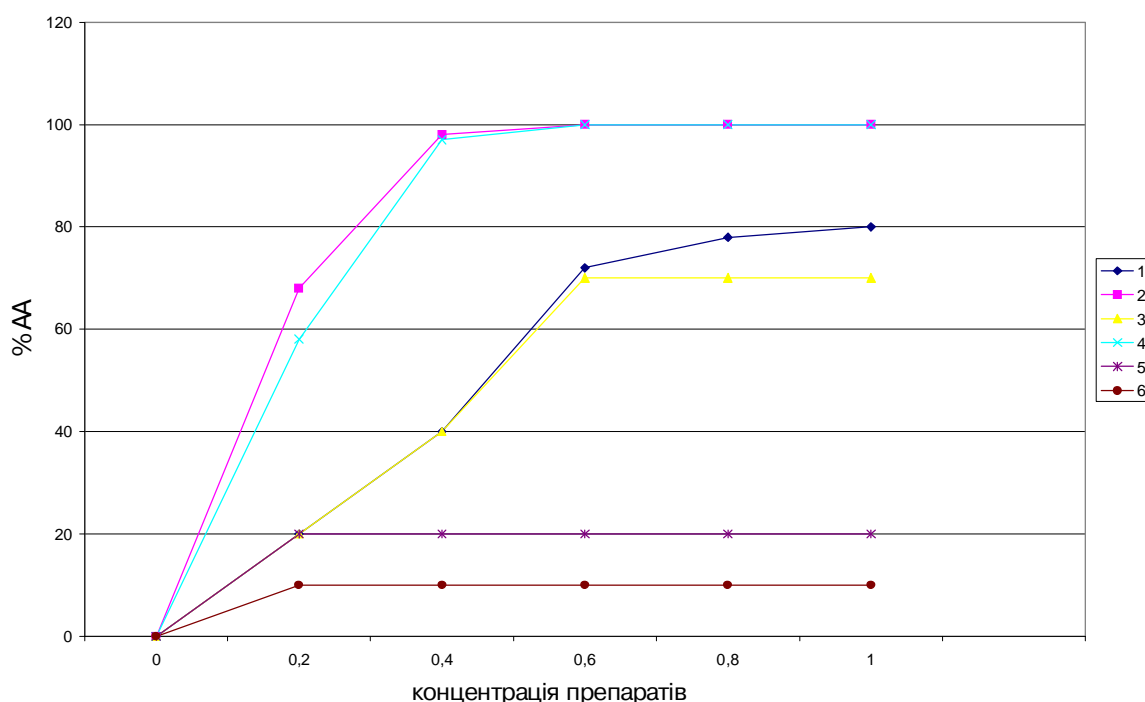


Рис. 2. Антигемолітична активність ліпосом з полімерами і полімерів у неспецифічному гемолізі, викликаному дією лаурил-сульфату.

Примітка. 1 – фосфатидилхолінові Лс із поліетиленіміном; 2 – фосфатидилхолінові Лс із сульфатом декстрану; 3 – фосфатидилхолін-холестеринові Лс із поліетиленіміном; 4 – фосфатидилхолін-холестеринові Лс із сульфатом декстрану; 5 – поліетиленімін; 6 – сульфат декстрану.

**ВИСНОВКИ.** 1. Полімери і полімерні наночастки зі значними зарядами (позитивним або негативним) проявляли високу антигемолітичну активність в інгібуванні імунного комплементзалежного гемолізу.

2. Полімерні ліпосоми мали меншу  $IC_{50}$ , ніж інтактні полімери, при інгібуванні імунного комплементзалежного гемолізу.

3. Полімерні наночастки проявляли високу антигемолітичну активність в інгібуванні неспецифічного гемолізу, викликаного дією детергенту.

4. Негативно заряджені полімерні наночастки проявляли високу антигемолітичну активність при меншій концентрації, ніж позитивно заряджені ліпосоми, в інгібуванні гемолізу, викликаного лаурил-сульфатом.

5. Додавання холестерину до фосфатидилхолінових ліпосом практично не впливало на їх активність.

6. Використання полімерних наночасток для інгібування гемолізу може мати місце при імплантації кардіопротезів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Albumin inhibits hemolysis of erythrocytes induced by ethanolamine oleate during endoscopic injection sclerotherapy / M. Ohta, M. Hashizume, K. Ueno, [et al.] // *Hepatogastroenterology*. – 1993. – **40**. – P. 65–68.
2. Bob van Dijk. Preventing RhD haemolytic disease of the newborn / Bob van Dijk // *BMJ*. – 1997. – **315**. – P. 1480–1481.
3. Hard charged liposomes inhibit complement-induced haemolysis / A. P. Kaplun, N. N. Ivanova, Yu. M. Krasnopolsky [et al.] // *The 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials. Proceedings. Stockholm*. – 1997. – P. 757–758.
4. Пат. 5776914 США, МКИ А61К 35/18. Prevention of hemolysis / Weisz, Paul B. Macarak, Edward J. (США). – Оубл. 07.07.98. – НКИ 424/533. – 4 с.
5. Shpakova N. M. Antihemolytic effect of chlorpromazine on erythrocytes in hyperosmotic and cold shock / Shpakova N. M., Pantaler E. R., Bondarenko V. A. // *Biochemistry*. – 1995. – **60**. – P. 1624–1631.
6. Sullivan S. G. Inhibition of hemin-induced hemolysis by desferrioxamine: binding of hemin to red cell membranes and the effects of alteration of membrane sulfhydryl groups / S. G. Sullivan, E. Baysal, A. Stern // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1992. – **1104**, № 1. – P. 38–44.

Н.Н. Иванова<sup>1</sup>, А.П. Каплун<sup>2</sup>, В.И. Швець<sup>2</sup>

ИНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ<sup>1</sup>, ХАРЬКОВ  
МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ТОНКОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА<sup>2</sup>

## ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕМОЛИЗА ПОЛИМЕРАМИ И ЛИПОСОМАМИ

### Резюме

Установлено, что положительно или отрицательно заряженные полимеры и полимерные нановезикулы с большой плотностью заряда проявляют высокую антигемолитическую активность в ингибировании иммунного гемолиза. Полимерные фосфатидилхолиновые везикулы имеют меньшую  $IC_{50}$ , чем интактные полимеры без фосфатидилхолина.

Отрицательно заряженные полимерные нановезикулы проявляли большую антигемолитическую активность при меньшей концентрации, чем положительно заряженные, в ингибировании неспецифического гемолиза, вызванного действием сурфактантов. Полимеры без липосом были малоэффективными в ингибировании неспецифического гемолиза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемолиз, липосомы, полимеры, антигемолитическая активность.

N.M. Ivanova<sup>1</sup>, A.P. Kaplun<sup>2</sup>, V.I. Shvets<sup>2</sup>

INSTITUTE OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY OF UKRAINE<sup>1</sup>, KHARKIV  
M.V. LOMONOSOV STATE ACADEMY OF FINE CHEMICAL TECHNOLOGY<sup>2</sup>

## INHIBITION OF HAEMOLYSIS USING LIPOSOMES AND POLYMERS

### Summary

It was determined that the positive or negative polymers and the polymeric nanoparticles with strong charges show the high antihemolytic activity in the inhibiting of immune hemolysis. The polymeric liposomes from egg phosphatidylcholine had smaller  $IC_{50}$  than the polymers without liposomes.

The negatively charged polymeric nanoparticles showed the bigger antihemolytic activity at the smaller concentration, than the positively charged polymeric nanoparticles in the inhibiting of nonspecific hemolysis, caused by detergent's action. The polymers without liposomes were ineffective in the inhibition of nonspecific hemolysis.

KEY WORDS: hemolysis, liposomes, polymers, antihemolytic activity.

Отримано 20.12.10

Адреса для листування: Н.М. Иванова, вул. Танкопия, 7/1, кв. 12, Харків, 61060, Україна.