

Изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» эритроцитов терпено-индольными алкалоидами

О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин

Воронежский государственный университет;
Российская Федерация, 394006, Воронеж, Университетская пл. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Тринеева Ольга Валерьевна – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета (ВГУ). Тел.: +7 (906) 583-63-90. E-mail: trineevaov@mail.ru

Халахакун Мудиянселлаге Амила Дживанта – стажер кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ВГУ. Тел.: +7 (950) 774-86-03. E-mail: amilajh1982@hotmail.com

Сливкин Алексей Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ВГУ. Тел.: +7 (910) 243-67-88. E-mail: slivkin@pharmvsu.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Одним из основных направлений развития современной фармации в области онкологии является создание более совершенных форм известных биологически активных веществ (БАВ) с целью их эффективной доставки в целевые клетки. Терпено-индольные алкалоиды (ТИА) винкристин (VCR) и винбластин (VBL) эффективно подавляют пролиферацию опухолевых клеток, но не оказывают избирательного действия, влияя как на больные, так и на здоровые клетки. Комплексно решить перечисленные проблемы можно с помощью направленного транспорта.

Цель работы – изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» противоопухолевых препаратов катарантуса розового (VCR и VBL) при получении иммобилизованных клеточных форм данных лекарственных веществ.

Материал и методы. Модифицированные формы VCR и VBL были получены путем их включения в эритроцитарные носители модифицированным методом гипоосмотического лизиса. «Загрузку» эритроцитов ТИА проводили также при наличии в среде инкубации модифицирующих агентов: апротонного растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленгликолей (ПЭГ-4000, ПЭГ-400) и аденозинтрифосфата (АТФ). Для обнаружения и количественного определения VCR и VBL применяли УФ-спектральные характеристики данных препаратов и спектрофотометрическую методику. Выделение ТИА из эритроцитарных носителей осуществляли методом гель-хроматографии.

Результаты. В средах, модифицированных ПЭГ-4000 и ПЭГ-400, значительно увеличивается осмотическое давление по сравнению с немодифицированной средой. Эффективность включения в свежее-изолированные эритроциты составляла в среднем для VCR 42,963% и VBL – 44,266%. В модифицированных средах выявлена высокая эффективность загрузки ТИА-препаратов: в среде ПЭГ для VCR – 65,699 % для VBL – 55,857%; в среде с ДМСО для VCR – 61,071%, для VBL – 62,425%; в среде с АТФ для VCR – 49,608% и для VBL – 49,228%.

Заключение. Модификация среды для инкубирования при получении эритроцитарных форм ТИА-препаратов методом гипоосмотического лизиса приводит к увеличению эффективности загрузки VCR и VBL. Наиболее высокая эффективность загрузки ТИА-препаратов в эритроциты (увеличение на 10–20%) была показана в средах, модифицированных ПЭГ и ДМСО.

Ключевые слова: направленный транспорт лекарственных веществ, винкристин, винбластин, эритроцитарные носители, эффективность включения, модифицированные среды.

Для цитирования: Тринеева О.В., Халахакун А.Д., Сливкин А.И. Изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» эритроцитов терпено-индольными алкалоидами. Фармация, 2018; 67 (7): 32–37. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-06>

STUDY OF THE POSSIBILITY OF ENHANCING THE EFFICIENCY OF ERYTHROCYTE LOADING WITH TERPENE-INDOLE ALKALOIDS

O.V. Trineeva, A.D. Khalakhakun, A.I. Slivkin

Voronezh State University; 1, Universitetskaya Sq., Voronezh 394006, Russian Federation;

INFORMATION ABOUT THE AUTHOS

Trineeva Olga Valeryevna – doctor of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty of VGU. Tel.: +7 (906) 583-63-90. E-mail: trineevaov@mail.ru

Halahakoon A. Jeewantha – trainee of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical faculty, Voronezh State University. Tel.: +7 (950) 774-86-03. E-mail: amilajh1982@hotmail.com

Slivkin Alexey Ivanovich – doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, dean of pharmaceutical faculty of VGU. Tel.: +7 (910) 243-67-88. E-mail: trineevaov@mail.ru

SUMMARY

Introduction. One of the main directions in the development of modern oncology pharmacy is to design more advanced formulations of known biologically active substances for their effective delivery to the target cells. The terpene-indole alkaloids (TIAs) vincristine (VCR) and vinblastine (VBL) effectively inhibit the proliferation of tumor cells, but have no selective effect, by affecting both infected and healthy cells. The aforementioned problems can be comprehensively solved via targeted transport.

Objective: to investigate the possibilities of enhancing the loading efficiency of anticancer agents derived from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) (VCR and VBL) when preparing immobilized cell formulations of these drugs.

Material and methods. The modified formulations of VCR and VBL were obtained through their inclusion in the erythrocyte carriers, by using the modified hypoosmotic lysis method. The loading of erythrocytes with TIA was also carried out in the incubation medium containing the modifying agents: the aprotic solvent – dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene glycols (PEG-4000 and PEG-400), and adenosine triphosphate (ATP). For the detection and quantitative determination of VCR and VBL, the UV-spectral characteristics of these drugs and spectrophotometric methods were used. TIAs were isolated from the erythrocyte carriers by means of gel chromatography.

Results. Osmotic pressure was substantially increased in the PEG-4000- and PEG-400-modified media compared to the non-modified medium. The efficiency of inclusion in the freshly isolated red blood cells averaged 42.963% for VCR and 44.266% for VBL. The modified media showed the high loading efficiency of TIAs: VCR (65.699%) and VBL (55.857%) in the PEG medium; VCR (61.071%) and VBL (62.425%) in the DMSO medium; VCR (49.608%) and VBL (49.228%) in the ATP medium.

Conclusion. Modification of the incubation medium while preparing of the erythrocyte forms of TIAs by hypoosmotic lysis leads to the higher loading efficiency of VCR and VBL. The highest (10-20% increase) efficiency of TIA loading into the red blood cells was seen in the PEG- and DMSO-modified media.

Key words: targeted drug transport, vincristine, vinblastine, erythrocyte carriers, inclusion efficiency, modified media.

For citation: Trineeva O.V., Khalakhakun A.D., Slivkin A.I. Study of the possibility of enhancing the efficiency of erythrocyte loading with terpene indole alkaloids. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2018; 67 (7): 32–37. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-06>

Введение

Одним из основных направлений развития современной фармации в области онкологии является создание более совершенных форм известных биологически активных веществ (БАВ) с целью их эффективной доставки в целевые клетки. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире ежегодно регистрируют более 14 млн новых случаев онкологических заболеваний. Прогнозируется, что в ближайшие 20 лет число онкобольных возрастет на 70%. При использовании традиционных химиотерапевтических лекарственных веществ в клинической практике возникают такие серьезные проблемы, как низкая молекулярная масса, обуславливающая их быстрое выведение из организма, неизбежность биологического действия, а также плохая растворимость в воде. Так, например, терпеноиндольные алкалоиды (ТИА) винкрестин (VCR) и винбластин (VBL) эффективно подавляют пролиферацию опухолевых клеток, но не оказывают избирательного действия, воздействуя, как на больные, так и на здоровые клетки. Помимо этого, существует еще одна важная проблема – развитие резистентности опухолевых кле-

ток к действию БАВ. Комплексным решением перечисленных проблем является использование направленного транспорта, что увеличивает время пребывания БАВ в кровотоке, при этом также обеспечивается их неспецифическое накопление и контролируемое высвобождение в солидных опухолях [1–3].

Цель работы – изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» противоопухолевых препаратов катарантуса розового (VCR и VBL) при получении иммобилизованных клеточных форм данных лекарственных веществ.

Материал и методы

Сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета были получены модифицированные формы известных в терапии онкологических заболеваний ТИА – VCR и VBL – путем их включения в эритроцитарные носители (ЭН) [3]. Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VBL использовали модифицированный метод гипоосмотического лизиса. «Загрузку» эритроцитов ТИА проводили также при наличии в среде инкубации модифицирующих агентов: апротонно-

го растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленгликолей (ПЭГ 4000, ПЭГ 400) и аденозинтрифосфата (АТФ).

Некоторые физические факторы способствуют пассивному проникновению веществ через мембрану: концентрационный (химический) градиент, электрохимический градиент, электростатический градиент (для процессов фильтрации), осмотический градиент, градиент растворимости на границе 2 несмешивающихся фаз (например, липидной и водной). Они обеспечивают пассивное движение веществ.

На эффективность загрузки эритроцитов может влиять внутреннее осмотическое давление и внешняя среда эритроцитов. Создание большого переходного осмотического градиента через мембрану эритроцитов может влиять на эффективность инкапсулирования молекулы внутри эритроцитов. Рассмотрена возможность применения ПЭГ и ДМСО для создания высокого осмотического градиента через мембрану эритроцитов. ПЭГ помогает в снижении агрегации эритроцитов и обладает свойством скрывать эпитопы антигенов мембраны клеток. Также ПЭГ обеспечивает надежную защиту от воздействия экстремальных факторов окружающей среды и минимизирует повреждения клеточных мембран. ДМСО является апротонным растворителем и применяется в осмотическом импульсном методе загрузки для создания большого переходного осмотического градиента через мембрану эритроцитов. В данной работе для создания высокой осмотической градиенты в инкубирующей среде применяли ДМСО.

Для обнаружения и количественного определения VCR и VBL применяли УФ-спектральные

характеристики данных препаратов и использовали спектрофотометрическую методику. Выделение ТИА из ЭН осуществляли методом гель-хроматографии [4–7].

АТФ – основной источник энергии в эритроцитах, участвует в поддержании их формы и объема. Внутриклеточная концентрация АТФ составляет 10^{-3} М, а в плазме крови она не превышает 10^{-6} М. Энергия, выделяющаяся при разрыве макроэргической связи АТФ, обеспечивает активный транспорт катионов через мембрану, поддержание оптимального соотношения концентраций K^+ и Na^+ (поддержание нормальной работы Na^+/K^+ каналов), сохранение формы и целостности мембраны эритроцита и образования мембранного потенциала эритроцитов. В проведенном эксперименте рассматривались характеристики загрузки ТИА-препаратов в эритроцитах в присутствии высокой концентрации АТФ (2,2 мг/мл) в инкубирующей среде. АТФ имеет пик максимального поглощения в УФ-области при длине волны 260 нм, и это затрудняет обнаружение VBL, который имеет максимум поглощения при длине волны 268 нм. После процесса гель-фильтрации в полученном фильтрате содержание АТФ довольно высокое, что мешает обнаружению ТИА-препаратов. VCR и VBL растворяются в хлороформе (1:30), АТФ практически не растворяется.

Была разработана методика для изолирования ТИА-препаратов от АТФ на основе их растворимости в хлороформе (рис. 1). Использовали ТИА-препараты после гель-фильтрации из полученного элюата экстрагирования с помощью хлороформа в соотношении 1:2 в щелочной среде при температуре $20^{\circ}C$. Затем ТИА, растворенные в хлороформе, экстрагировали с помощью очищенной воды (1:1) в кислой среде. Полученный водный экстракт нейтрализовали и спектрофотометрическим методом определяли содержание ТИА-препаратов в водном экстракте.

Для инкубирования препаратов применяли среду, модифицированную разной концентрацией ПЭГ-400 и ПЭГ-4000 (соотношение содержания ТИА-препаратов: ПЭГ – 1:5, 1:10, 1:20; 1:50;

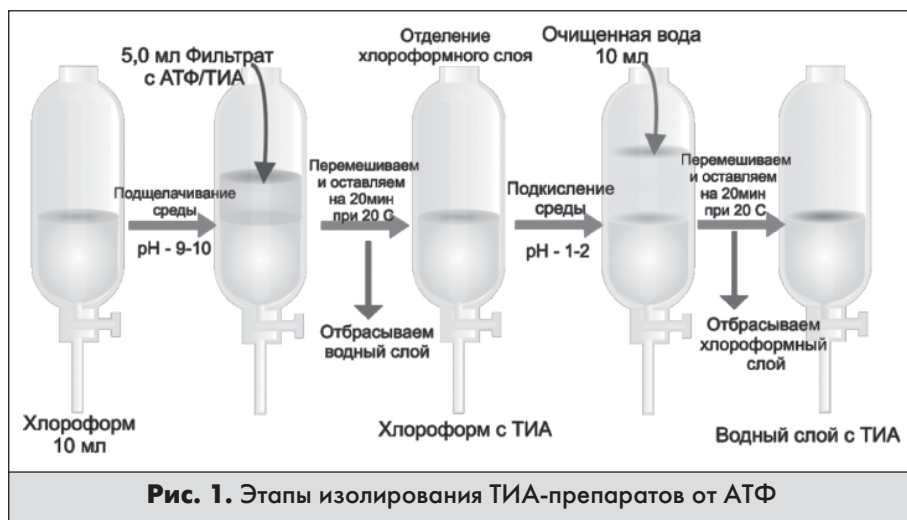


Рис. 1. Этапы изолирования ТИА-препаратов от АТФ

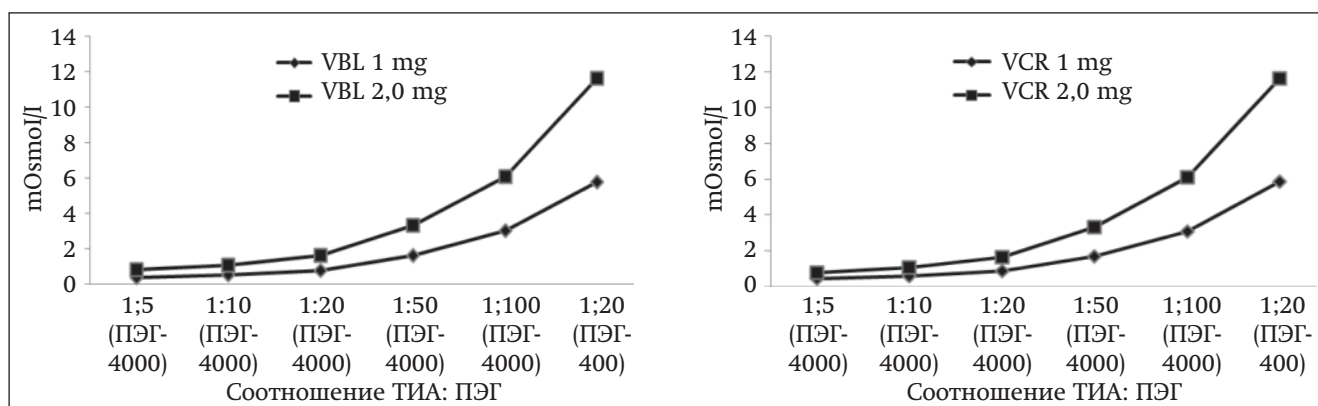


Рис. 2. Изменения осмотического давления в разных растворах ТИА: ПЭГ

1:100); ДМСО и АТФ (в обоих случаях с содержанием 2 мг/мл). Осмотическое давление в среде рассчитывали по формуле:

$$\Pi = iCRT,$$

где i – изотонический коэффициент раствора; C – молярная концентрация раствора, моль/м³; R – универсальная газовая постоянная; T – термодинамическая температура раствора.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам, в средах, модифицированных ПЭГ-4000 и ПЭГ-400, значительно увеличивается осмотическое давление

по сравнению с немодифицированной средой (рис. 2).

На следующем этапе исследования была изучена эффективность загрузки ТИА-препаратов в клеточные носители в различных модифицированных средах (табл. 1–3). Так, в модифицированной среде ПЭГ (см. табл. 1) была установлена высокая эффективность загрузки (увеличение на 10–20% в разных случаях). При высокой концентрации ПЭГ-4000 (ТИА:ПЭГ – 1:50, 1:100) эффективность загрузки ТИА-препаратов значительно уменьшалась, максимум загрузки отмечался при соотношении ТИА: ПЭГ-400 – 1:20 для VCR – 65,699% и VBL – 55,857%.

Таблица 1

Эффективность загрузки ТИА-препаратов в клеточные носители в модифицированной среде с ПЭГ

№ колонки	Марка ПЭГ	Взято для инкубирования, мкг	Соотношения ТИА: ПЭГ	Инкапсулированное количество, мкг	Эффективность загрузки E, %	Метрологические характеристики (P – 95%)
VCR						
I	ПЭГ 4000	2200	1:5	1190,686	54,122	$\bar{X} = 53,302$ $SD = 12,318$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 53,302 \pm 15,314 \%$ $\xi = 64,243 \%$
II	ПЭГ 4000	2200	1:10	1428,849	64,948	
III	ПЭГ 400	2200	1:20	1445,387	65,699	
IV	ПЭГ 4000	2200	1:50	942,865	42,857	
V	ПЭГ 4000	2200	1:100	855,488	38,886	
VBL						
I	ПЭГ 4000	2000	1:10	907,674	45,384	$\bar{X} = 46,106$ $SD = 7,003$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 46,106 \pm 8,707 \%$ $\xi = 42,228 \%$
II	ПЭГ 4000	2000	1:20	1000,639	50,032	
III	ПЭГ 4000	2000	1:50	808,223	40,411	
IV	ПЭГ 4000	2000	1:100	776,890	38,844	
V	ПЭГ 400	2000	1:20	1117,146	55,857	

Примечание. Здесь и далее колонки отличались высотой слоя сорбента, скоростью сбора элюента и объемом подвижной фазы.

Согласно данным литературы, наиболее вероятный механизм связывания VCR и VBL с эритроцитами – фиксация на клеточной мембране. Возможно также проникновение ТИА, диссоциирующих на ионы, внутрь эритроцитов через белковые каналы мембраны. Известно, что молекулы

ДМСО обладают амфифильностью, что позволяет им погружаться в липидную фазу биомембран, изменять ее стабильность и проницаемость для других соединений.

Полученные результаты показывают высокую эффективность загрузки ТИА-препаратов в эритроциты в модифицированной среде с концентрацией ДМСО 2,0 мг/мл (см. табл. 2). Для VCR и VBL она составила 61,071±3,210% и 62,425±3,144% соответственно.

Таблица 2

Эффективность загрузки ТИА-препаратов в клеточные носители в модифицированной среде с ДМСО

№ колонки	Взято для инкубирования, мкг	Инкапсулированное количество, мкг	Эффективность загрузки E, %	Метрологические характеристики (P – 95%)
VCR				
I	2200	1377,341	62,606	$\bar{X} = 61,071$ $SD = 2,5821$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 61,071 \pm 3,210 \%$ $\xi = 11,7540 \%$
II	2200	1254,739	57,034	
III	2200	1325,765	60,262	
IV	2200	1358,654	61,757	
V	2200	1401,321	63,696	
VBL				
I	2200	1408,105	64,005	$\bar{X} = 62,425$ $SD = 2,5288$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 62,425 \pm 3,144 \%$ $\xi = 11,2618 \%$
II	2200	1287,311	58,514	
III	2200	1398,345	63,561	
IV	2200	1423,908	64,723	
V	2200	1349,087	61,322	

Таблица 3

Эффективность загрузки ТИА-препаратов в клеточные носители в модифицированной среде с АТФ

№ колонки	Взято для инкубирования, мкг	Инкапсулированное количество, мкг	Эффективность загрузки E, %	Метрологические характеристики (P – 95%)
VCR				
I	2200	1001,8743	45,5397	$\bar{X} = 49,608$ $SD = 3,4161$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 49,608 \pm 4,247 \%$ $\xi = 19,1435 \%$
II	2200	1053,6402	47,8927	
III	2200	1114,9395	50,6791	
IV	2200	1083,1154	49,2325	
V	2200	1203,3340	54,6970	
VBL				
I	2200	936,6816	42,5764	$\bar{X} = 49,228$ $SD = 4,7126$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 49,228 \pm 5,859 \%$ $\xi = 26,6129 \%$
II	2200	1224,9609	55,6800	
III	2200	1072,9837	48,7720	
IV	2200	1115,0303	50,6832	
V	2200	1065,4529	48,4297	

Эффективность включения ТИА-препаратов в эритроциты в модифицированной среде с 2 мг/мл АТФ (см. табл.3) составила в среднем для VCR – 49,608±4,247% и для VBL – 49,228±5,859% соответственно. Добавление АТФ в среду для инкубирования ТИА-препаратов приводит к росту эффективности на 5–7% за счет увеличения проницаемости мембраны с участием АТФ.

Заключение

Проведенные исследования показали, что модификация среды для инкубирования при получении эритроцитарных форм ТИА-препаратов методом гипосмотического лизиса приводит к увеличению эффективности загрузки VCR и VBL. Наиболее высокая эффективность загрузки ТИА-препаратов в эритроциты была зафиксирована в средах, модифицированных ПЭГ и ДМСО (увеличение на 10–20% в разных случаях).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Заборовский А.В., Гуревич К.Г. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть I. Однократное введение. Сибирский онкологический журнал, 2017; 16 (1): 59–65. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-1-59-65
2. Заборовский А.В., Гуревич К.Г. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть II. Многократное введение. Сибирский онкологический журнал, 2017; 16 (2): 36–41. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-2-36-41
3. Тринеева О.В., Халахакун А.Д., Сливкин А.И., Чупандина Е.Е. Морфологические и физико-химические свойства эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпено-индольными алкалоидами. Разработка и регистрация лекарственных средств, 2018;1: 40–4.
4. Ó'Fágáin C., Cummins P.M., O'Connor B.F. Gel-Filtration Chromatography. Protein Chromatography Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology (ed. D. Walls, S.T. Loughran). Totowa, NJ: Humana Press, 2011; 25–33. DOI https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_2
5. Nikolayenko I.V. et al. Preparation of highly purified human IgG, IgM and IgA for immunization and immunoanalysis. Ukrainica Bioorganica Acta, 2005; 2: 3–11.
6. Stratton F., Smith D.S., Rawlinson V.I. Value of gel filtration on Sephadex G-200 in the analysis of blood group antibodies. Journal of Clinical Pathology, 1968; 21(6): 708–14.
7. Лопухов Л.В. и др. Хроматографические методы очистки белков. Казань: КФУ, 2013; 1–48.

References

1. Zaborovsky A.V., Gurevich K.G. Modeling of directional transport of medicinal substances. Part I. Single entry. Sibirskiy onkologicheskij zhurnal, 2017; 16 (1): 59–65 (in Russian).
2. Zaborovsky A.V., Gurevich K.G. Modeling of directional transport of medicinal substances. Part II. Multiple introduction. Sibirskiy onkologicheskij zhurnal, 2017; 16 (2): 36–41 (in Russian).
3. Trineeva O.V., Halahakun A.D., Slivkin A.I., Chupandina E.E. Morphological and physicochemical properties of erythrocyte carriers encapsulated by terpene-indole alkaloids. Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv, 2018; 1: 40–4 (in Russian).
4. Ó'Fágáin C., Cummins P.M., O'Connor B.F. Gel-Filtration Chromatography. Protein Chromatography Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology (ed. D. Walls, S.T. Loughran). Totowa, NJ: Humana Press, 2011; 25–33.
5. Nikolayenko I.V. et al. Preparation of highly purified human IgG, IgM and IgA for immunization and immunoanalysis. Ukrainica Bioorganica Acta, 2005; 2: 3–11.
6. Stratton F., Smith D.S., Rawlinson V.I. Value of gel filtration on Sephadex G-200 in the analysis of blood group antibodies. Journal of Clinical Pathology, 1968; 21 (6): 708–14.
7. Lopuhov L.V. et al. Chromatographic methods for protein purification. Kazan: KFU, 2013; 1–48 (in Russian).

Поступила 27 апреля 2018 г.