

УДК 615.322; 612.111.15; 612.117.5

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНОИНДОЛЬНЫМИ АЛКАЛОИДАМИ

О.В. Тринеева<sup>1\*</sup>, А.Д. Халахакун<sup>1</sup>, А.И. Сливкин<sup>1</sup>, Е.Е. Чупандина<sup>1</sup>

**Резюме.** Изучены морфологические и физико-химические свойства эритроцитов, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами (ТИА), методами нефелометрии и осмотической резистентности эритроцитов в среде с низкими концентрациями хлорида натрия. Исследованы изменения морфологических и физико-химических параметров у ТИА-загруженных эритроцитарных носителей и свежееизолированных эритроцитов. Установлено, что при процессе инкапсулирования ТИА модифицированным методом гипотонического набухания морфологические и физико-химические параметры эритроцитов незначительно изменяются по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** эритроцитарные носители, терпеноиндольные алкалоиды, нефелометрия, рефрактометрия, адресные системы доставки лекарственных средств.

### MORPHOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE CARRIERS INCAPULATED BY TERPENEINDOLIC ALKALOIDS

O.V. Trineeva<sup>1\*</sup>, A.J. Halahakoon<sup>1</sup>, A.I. Slivkin<sup>1</sup>, E.E. Chupandina<sup>1</sup>

**Abstract.** Morphological and physico-chemical properties of erythrocytes encapsulated by terpenoid alkaloids (TIA) by nephelometry and osmotic resistance of erythrocytes in a medium with low concentrations of sodium chloride have been studied. Changes in the morphological and physico-chemical parameters of TIA-loaded erythrocyte carriers and freshly isolated erythrocytes have been studied. It was found that during the process of encapsulation of TIA by a modified hypotonic swelling method, the morphological and physicochemical parameters of erythrocytes change insignificantly in comparison with the control.

**Keywords:** erythrocyte carriers, terpenoid alkaloids, nephelometry, refractometry, targeted drug delivery systems.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1

1 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

\* адресат для переписки:  
E-mail: trineevaov@mail.ru  
Тел.: 8 (473) 253 07 89

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из ведущих тенденций, появившихся в современной фармакологии, является создание систем направленного транспорта лекарств. Среди потенциальных носителей лекарственных веществ особое место занимают форменные элементы крови (эритроциты), в которые при определенных условиях может быть инкапсулирована достаточно высокая доза препаратов без заметного повреждения клетки [1–4]. К достоинствам эритроцитов как транспортной формы лекарств относятся идеальная биосовместимость (при использовании аутологичных клеток), отсутствие токсических продуктов деградации, длительность обращения в кровотоке, доступность в препаративном количестве. При внутривенном введении препаратов в составе эритроцитарных «контейнеров» могут быть достигнуты как увеличение времени циркуляции лекарства, так и его преимущественная доставка в органы и ткани ре-

тикулоэндотелиальной системы (РЭС). Большой интерес вызывает возможность использования эритроцитов в качестве носителей ТИА-препаратов в целях уменьшения их побочных эффектов.

В процессе инкапсулирования эритроцитов соответствующие фармакологические вещества могут повреждать целостность эритроцитов. Сильно поврежденные эритроциты могут быстро элиминировать из кровотока с участием макрофагов в РЭС. Известны примеры успешного экспериментального получения и клинического использования эритроцитарных носителей (ЭН) различных классов лекарственных средств (антибиотиков, противоопухолевых препаратов, ферментов и др.) [5, 6]. Однако недостаточно изученными остаются вопросы влияния экстракорпорального насыщения препаратами эритроцитов на морфологические и функциональные свойства клеток. Эффективность эритроцитов в качестве носителя прямо зависит от степени по-

вреждения морфологических и физико-химических свойств после их инкапсуляции эритроцитов. Результаты исследований в этом направлении могут способствовать уточнению механизмов взаимодействия ТИА с эритроцитами в условиях обработки клеток *in vitro*, позволяя прогнозировать поведение эритроцитов-переносчиков в организме.

Целью настоящей работы являлась оценка морфологических и физико-химических свойств эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпеноидными алкалоидами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве клеточной модели для исследований на мембранном уровне использовались свежееизолированные человеческие эритроциты и ТИА инкапсулированные эритроцитарные формы. В качестве ТИА-препаратов применяли винкрестина сульфат (VCR) и винбластин сульфат (VBL), которые соответствовали требованиям частных фармакопейных статей государственных фармакопей (ГФ): США – UPS 30-NF25 («VINBLASTINE SULFATE FOR INJECTION», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINBLASTINE SULFATE», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINCRISTINE SULFATE FOR INJECTION», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINCRISTINE SULFATE», PF 32(5), Pg. 1470); Европы – Eph. 8 («VINCRISTINE SULFATE», Pg. 3536; «VINBLASTINE SULFATE», Pg. 3535); Японии – J.Ph. XVII («VINCRISTINE SULFATE», Pg. 1764; «VINBLASTINE SULFATE», Pg. 1762); Британии – BPh 2013. Были использованы следующие препараты: «Винкрестин-Тева» – раствор для внутривенного введения 2 мг/2 мл [рег. № П N015355/01 от 18.09.08, Teva Pharmaceutical Industries (Израиль) / PHARMACHEMIE (Нидерланды)]; «Веро-винкрестин», раствор для внутривенного введения 1 мг/2 мл [рег. № P N002383/01-2003 от 02.04.08, «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия)]; «Винкрестин-Рихтер», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 1 мг; (код EAN: 5997001358955; рег. № П N014883/01, 2008-06-11); «Винбластин-ЛЭНС», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 5 мг [рег. № P N000203/01 от 18.08.06, «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия), дочерняя компания «БЕРОФАРМ» (Россия)].

Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VBL использовали модифицированный метод гипоосмотического лизиса. Объектами исследования служили эритроциты крови, полученные от здоровых доноров с соблюдением всех мер безопасности, под наблюдением медицинских специалистов. Эритроциты выделяли центрифугированием (центрифуга ЦЛН-2 и ОПН-8, Россия) при 3000 об/мин в течение 5 мин при +4 °С. Супернатант отбрасывали, полученную гранулированную клеточную массу суспендировали в 5-кратном объеме 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора с pH=7,4 («ПанЭко», Россия, серия 1116) при +4 °С в течение 5 мин и центрифугировали при 8000 об/мин в течение

5 мин при комнатной температуре. Супернатант отбрасывали, в полученную компактную клеточную массу (1,0 мл) добавляли 4-кратный объем (4,0 мл) гипотонического раствора NaCl (0,65%), охлажденного до 0 °С, для проведения гипотонического лизиса и смесь выдерживали 5 мин при 0 °С. Далее содержимое центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин и супернатант отбрасывали, в полученную компактную клеточную массу добавляли 8 мл (125 мкг/мл, 250 мкг/мл, 275 мкг/мл) водного стандартного раствора препарата (VCR, VBL), охлажденного до 0 °С по фракциям до полного гемолиза и все инкубировали при +4 °С в течение 20 мин. Затем восстанавливали цельность эритроцитов добавлением 9,0% гипертонического раствора NaCl до изотоничности. Полученную суспензию инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После включения препарата в эритроциты последние дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида (0,9%), затем осаждали при +4 °С в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, полученную иммобилизованную форму препарата в эритроцитах хранили в холодильнике при +4 °С с добавлением 1,0 мл 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора.

Все химические субстанции, которые применялись для приготовления различных реактивов и растворов, соответствовали категории «ч.д.а.» (ЗАО «Вектон», Россия).

Приготовление буферных растворов осуществляли в соответствии с ОФС «Буферные растворы» ГФ XIII [10]. Контроль pH растворов осуществлялся при помощи pH-метра pH-150M (ПУП «Гомельский завод измерительных приборов»).

Для изучения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) был использован метод нефелометрии, позволяющий оценить зависимость физиологического состояния и химического состава частиц от светопрозрачности. Методика определения ОРЭ достаточно точна, объективна, легко выполнима и, главное, позволяет охарактеризовать не только минимальную и максимальную резистентность клеток, но и динамику гемолиза.

Для инкубации эритроцитов и ТИА-инкапсулированных эритроцитов использовали 0,01 М Na-фосфатный буферный раствор с pH=7,4, в котором клетки сохраняют свои функциональные свойства в течение нескольких суток. Под нефелометрией обычно понимают ряд построений, использующих данные по зависимости мутности ( $\tau$ ) системы от длины волны ( $\lambda$ ) падающего света.

$$\tau = 2,3A/l,$$

где A – оптическая плотность, l – длина кюветы. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см относительно 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора с pH=7,4.

Размер эритроцитов определяли после экспериментального определения  $\mu_{эр}$  – относительного показателя преломления эритроцитов по формуле [7]:

$$\bar{r} = \frac{\mu_{эр} \cdot \alpha}{4\pi \cdot \mu_0 (m - 1)},$$

где  $\bar{r}$  – радиус эритроцитов;  $m$  – относительный показатель преломления среды, ( $m = \mu_{эр} / \mu_0$ ),  $\mu_{эр}$  – относительный показатель преломления эритроцитов,  $\mu_0$  – относительный показатель преломления инкубирующей среды;  $\alpha$  – функция относительного размера ( $\alpha = 2\pi r / \lambda$ ).

Относительный показатель преломления эритроцитов ( $\mu_{эр}$ ) определяли рефрактометрическим методом на рефрактометре ИРФ-454 Б2М (Россия), для чего готовили серию инкубационной среды, в которой относительный показатель преломления ( $\mu_0$ ) находился в пределах 1,3–1,4 с градиентом 0,01. Для изменения относительного преломления среды ( $m$ ) в инкубирующую среду добавляли разное количество полиэтиленгликоля (ПЭГ-4000). По 0,2 мл контрольных и ТИА-инкапсулированных эритроцитов разбавляли до 2,0 мл Na-фосфатным буферным раствором. В каждую пробирку добавляли по 0,1 мл разбавленной суспензии эритроцитов, тщательно перемешивая до полного диспергирования клеток. Затем измеряли спектральную зависимость оптической плотности каждой полученной суспензии в диапазоне длин волн 600–900 нм. Из зависимости оптической плотности ( $D$ ) от волновой экспоненты ( $n$ ) по определённому значению  $n$  из таблицы  $n = n(\alpha)$ , указанной в монографии В.И. Клинена [8], определяли значения  $\alpha$ . Далее в зависимости  $\sqrt[3]{D}$  от  $\mu_{эр}$  путем экстраполяции аппроксимальной ли-

нии тренда до абсциссы определяли  $\mu_{эр}$  (рисунок 1). Результаты представлены в таблице 1.

Расчет параметров ЭН проводили по известным формулам [9]:

- числовые концентрации эритроцитов в едином объёме:

$$N = \frac{12,6 \cdot \tau \cdot \mu_0^2}{\lambda_{ср}^2 \cdot K \cdot \alpha^2},$$

где  $K$  – коэффициент рассеяния [8];

- плотность эритроцита, г/см<sup>3</sup>:

$$\rho = 1 + 1,5 \cdot (m - 1);$$

- концентрация сухого вещества в эритроците, %:

$$C = 605,0 \cdot (m - 1);$$

- содержание сухого вещества в эритроците, пг:

$$C_{\%} = 3,15 \cdot (m - 1) \cdot \bar{r}^3;$$

- содержание воды в эритроците, %:

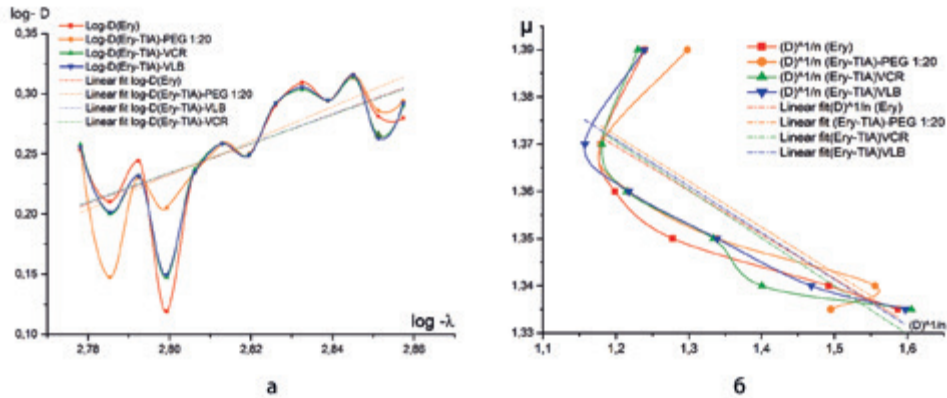
$$C_{в} = 100 - 0,75 \cdot C_{\%}.$$

Исследования ОРЭ проводили для нормальных эритроцитов и форм, нагруженных ТИА. Минимальная резистентность эритроцитов определяется максимальной концентрацией гипотонического (менее 0,85%) раствора натрия хлорида (в серии постепенно уменьшающихся концентраций), при которой начинается гемолиз наименее устойчивых эритроцитов, находящихся в растворе 1 ч. Максимальная резистентность

Таблица 1.

Физико-химические параметры ТИА-инкапсулированных эритроцитов ( $\lambda = 660$  нм;  $\mu_{ср} = 1,335$ )

№ п/п	Физико-химические параметры эритроцитов	Свободные эритроциты	ТИА-инкапсулированные эритроциты		
			Эри-ТИА-ПЭГ 1:20	Эри-ТИА-VCR	Эри-ТИА-VBL
1	Уравнения аппроксимирующей кривой в зависимости $\log D - \log \lambda$	$y = 1,2461x - 3,2557$	$y = 1,4256x - 3,7593$	$y = 1,2089x - 3,1507$	$y = 1,2089x - 3,1507$
2	Уравнения аппроксимирующей кривой в зависимости $\sqrt[3]{D} - \mu_{ср}$	$y = -0,0935x + 1,4817$	$y = -0,097x + 1,4882$	$y = -0,1017x + 1,4926$	$y = -0,0985x + 1,4892$
3	$\mu_{эр}$	1,4817	1,4882	1,4886	1,4892
4	$m$	1,10989	1,11476	1,11506	1,11551
5	$n$	1,2461	1,4256	1,2089	1,2244
6	$\rho$	11,8	10,6	11,0	11,0
7	$\bar{r}$ , мкм	4,2267	3,7930	3,7631	3,7487
8	Средний диаметр (d), мкм	8,4535	7,5861	7,5261	7,4975
9	$\rho$ эритроцитов, г/см <sup>3</sup>	1,1648	1,1696	1,1726	1,1733
10	Концентрация эритроцитов в 1 см <sup>3</sup> пробы (N)	$6,07 \cdot 10^7$	$9,07 \cdot 10^7$	$6,75 \cdot 10^7$	$7,56 \cdot 10^7$
11	Концентрация сухого вещества в эритроците (C), %	66,48135	69,4540	69,6113	69,8775
12	Содержание сухого вещества в эритроците ( $C_{\%}$ ), пг	209,1747	157,8731	143,0619	153,3324
13	Содержание воды в эритроците ( $C_{в}$ ), %	50,1390	47,9095	47,7915	47,5919
14	ППЭМ	1,32594	1,44864	1,45656	1,46853



**Рисунок 1.** а – определение  $n$  в зависимости  $\log D - \log \lambda$  у свободных эритроцитов и эритроцитов, инкапсулированных ТИА; б – определение  $\mu_{\text{ЭР}}$  в зависимости  $\sqrt[n]{D} - \mu_{\text{CP}}$  у свободных эритроцитов и эритроцитов, инкапсулированных ТИА

эритроцитов определяется максимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида, вызывающего в течение 1 ч гемолиз всех эритроцитов.

0,5 мл клеточной формы, загруженной ТИА-препаратами, разбавляли до 2,0 мл изотоническим Na-фосфатным буферным раствором с рН=7,4. Готовили ряд растворов, соответствующих растворам натрия хлорида с концентрациями в диапазоне 0,9–0,1%. В 10 пробирок для центрифугирования добавляли по 5,0 мл раствора и по 0,02 мл клеточной формы, затем инкубировали при 37 °С 60 мин. Далее центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из каждой пробирки сливали надосадочную жидкость и фотометрировали при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольной пробы. Контрольная проба – надосадочная жидкость, содержащая рабочий раствор с концентрацией натрия хлорида 1%. За полный (100%) гемолиз принимали гемолиз в пробирке с 0,1% раствором натрия хлорида. Вычисляли процент гемолиза, сравнивая величину экстинкции надосадочной жидкости с экстинкцией, принятой за 100%, по формуле:

$$\text{Гемолиз, \%} = \frac{E_i}{E_x} \cdot 100\%,$$

где  $E_i$  — экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% раствором натрия хлорида;  $E_x$  — экстинкция исследуемой пробы.

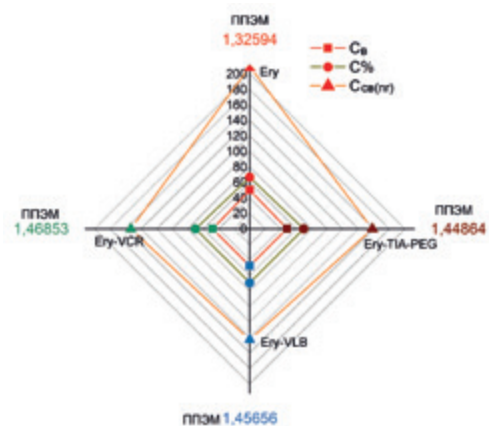
Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 ГФ XIII [10] при использовании пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016 на базе ОС Windows 10) и Originpro 2016 (2016 г. от компания OriginLab Corporation, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были изучены физико-химические свойства для ТИА-инкапсулированных эритроцитарных носителей и контрольных эритроцитов. При проведении срав-

нительного анализа физико-химических параметров эритроцитов установлен относительный показатель преломления ( $m$ ) у контрольных эритроцитов ( $1,10989 \pm 0,0001$ ) и у ТИА-инкапсулированных эритроцитов ( $1,11511 \pm 0,0010$ ) (при  $P > 0,05$ ). Абсолютный показатель преломления контрольных эритроцитов ( $\mu$ ) был равен  $1,4817 \pm 0,00045$ , а у ТИА-инкапсулированных эритроцитов –  $1,48867 \pm 0,00125$  (при  $P > 0,05$ ). Концентрация эритроцитов ( $N$ ) в контрольной пробе составила  $(6,07 \pm 0,009921) \times 10^7$  в  $\text{см}^3$ , а у ТИА-инкапсулированных –  $(7,57 \pm 2,0496) \times 10^7$  (при  $P > 0,05$ ).

Проницаемость мембран эритроцитов изучалась нами по изменению трех физико-химических показателей: концентрации ( $C$ , %), содержания сухого вещества ( $C_{\text{св}}$ , пг) и содержания воды ( $C_{\text{в}}$ , %) в эритроците. Для оценки нарушений проницаемости мембран эритроцитов нами был предложен показатель проницаемости мембран эритроцитов (ППЭМ), который представляет собой отношение содержания воды в эритроците ( $C_{\text{в}}$ ) к концентрации сухого вещества в эритроците ( $C_{\text{св}}$ ). В контрольных эритроцитах ППЭМ составлял  $1,32594 \pm 0,00232$ , а у ТИА-инкапсулированных эритроцитов – в среднем  $1,45791 \pm 0,02487$ . В таблице 2 представлены результаты, показывающие умень-



**Рисунок 2.** Физико-химические параметры ТИА-инкапсулированных и контрольных эритроцитов

шение ОРЭ в ТИА-инкапсулированных эритроцитах по отношению к контрольным. ТИА-инкапсулированные эритроциты гемолизируются в 0,40% растворе NaCl приблизительно на 60%, а контрольные в тех же условиях – на 30%. Данные рисунка 3 показывают, что эритроцитарные носители, заполненные ТИА в модифицированной среде с ПЭГ 1:20, показывают степень гемолиза несколько ниже, чем в немодифицированной среде.

Таблица 2.

Результаты определения степени гемолиза различных ТИА-загруженных эритроцитарных форм

Концентрация NaCl, %	Степени гемолиза K(Hb), %			
	Контрольные эритроциты	ТИА-эритроциты (Ery-TIA)	ТИА-ПЭГ-эритроциты (Ery-TIA-PEG)	ТИА-ДМСО-эритроциты (Ery-TIA-DMSO)
0,1	100	100	100	100
0,2	95,322	99,171	94,859	96,277
0,3	80,263	89,589	87,543	89,176
0,4	29,349	66,607	62,871	66,046
0,5	13,670	33,465	31,953	32,506
0,6	5,300	24,352	23,085	23,578
0,65	4,240	15,166	14,700	14,891
0,7	3,582	7,061	6,832	6,963
0,8	3,107	5,548	5,383	5,481
0,9	1,118	4,035	3,761	3,861

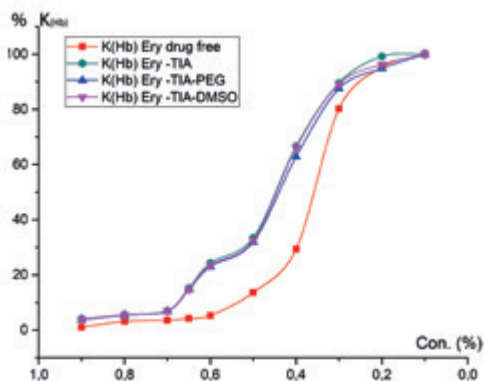


Рисунок 3. Степени гемолиза различных ТИА-загруженных эритроцитарных форм

В проведенном *in vitro* эксперименте с высвобождением гемоглобина из ТИА-инкапсулированных эритроцитарных форм установлено, что ущерб, нанесенный при инкапсуляции в эритроциты изучаемых лекарственных веществ, невелик и по функциональным способностям они незначительно отличаются от нормальных эритроцитов (рисунок 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение физико-химических свойств ТИА-инкапсулированных и контрольных эритроцитов показало изменения по некоторым параметрам, таким

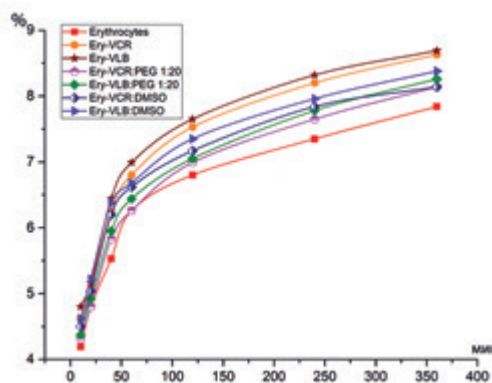


Рисунок 4. Высвобождение гемоглобина из ТИА-загруженных эритроцитов *in vitro*

как показатель проницаемости мембран эритроцитов, диаметр клеток, концентрация, содержание сухого вещества в эритроците, содержание воды в эритроците и степень гемолиза (таблицы 1 и 2), которые могут влиять на жизненный цикл ТИА-инкапсулированных ЭН в организме. В эксперименте *in vitro* установлено, что изменение физико-химических параметров почти не нарушает функциональные свойства ТИА-инкапсулированных эритроцитов. Установлено, что ТИА-инкапсулированные эритроциты восстанавливаются на 60–80%. Следовательно, показана возможность применения ТИА-загруженных ЭН в качестве систем для доставки противоопухолевых лекарственных средств – винкристина и винбластина.

## ЛИТЕРАТУРА

- C. Gutiérrez Millán et al. Cell-based drug-delivery platforms // *Therapeutic Delivery*. 2012. V. 3. № 1. P. 25-41.
- C.H. Villa, J. Seghatchian, V. Muzykantov. Drug delivery by erythrocytes: «Primum non nocere» // *Transfusion and Apheresis Science*. 2016. V. 55. № 3. P. 275–280.
- L. Rossi et al. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016. V. 106. P. 73–87.
- M. Magnani. *Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting*. – Texas: Springer, 2002. 151 p.
- S. Ravilla et al. Erythrocytes as carrier for drugs, enzymes and peptides // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012. V. 2. № 4. P. 166–176.
- P. Xu et al. Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems // *Onco Targets and Therapy*. 2016. V. 9. P. 2873–2884.
- АС SU 1337349 А1. Способ определения размера клеток / Б.И. Шварцбург. – № 3748690/28-14; заявл. 01.06.84; опубл. 15.09.87; Бюл. № 34.
- В.И. Кленин, С.Ю. Щеголев, В.И. Лаврушин. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. – Саратов: Саратовский университет, 1977. 177 с.
- О.И. Кулапина и др. Проницаемость мембран эритроцитов у больных с инфекционной патологией // *Критические технологии. Мембраны*. 2005. Т. 1. № 25. С. 3–11.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. URL: <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online> (дата обращения 10.12.2017).