

УДК 615.074

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ НОСИТЕЛЕЙ И КЛЕТОЧНЫХ ФОРМ ВИНКРИСТИНА И ВИНБЛАСТИНА ПРИ ХРАНЕНИИ

О.В. Тринеева^{1*}, А.Д. Халахакун¹

Резюме. Сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии были получены модифицированные формы известных в терапии онкологических заболеваний терпеноиндольных алкалоидов (ТИА) – винкристина (VCR) и винбластина (VBL) путем их включения в эритроцитарные носители (ЭН). Данный способ модификации позволяет решить одновременно проблемы направленного транспорта данных эффективных противоопухолевых препаратов и снижения частоты и силы побочных эффектов, а следовательно, и увеличения комплаентности больных к назначенному лечению. В данной работе проведены исследования стабильности и сроков годности инкапсулированных ТИА в ЭН. Установлено, что выдерживание ТИА-инкапсулированной эритроцитарной формы при температуре +4 °С до 7 дней является оптимальным условием для хранения ТИА-препаратов без значительного снижения терапевтической дозы (не ниже 95% от инкапсулированного количества).

Ключевые слова: винкрисдин, винбластин, направленный транспорт лекарственных веществ, эритроцитарные носители, степень гемолиза эритроцитов.

STUDY OF STABILITY OF CELL CARRIERS AND CELLULAR FORMS OF VINKRISTIN AND VINBLASTIN IN STORAGE

O.V. Trineeva^{1*}, A.J. Halahakoon¹

Abstract. Employees of the department of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology received modified forms of terpene-indole alkaloids (TIA) – vincristine (VCR) and vinblastine (VBL) known in the therapy of oncological diseases by incorporating them into erythrocyte carriers (EN). This method of modification allows solving simultaneously the problems of directional transport of effective antitumor drugs and reducing the frequency and strength of side effects, and, consequently, increasing the patient's compliance to the prescribed treatment. In this paper, stability and shelf life studies of encapsulated TIAs in EN have been carried out. It was found that keeping TIA encapsulated erythrocyte form at +4 °C for 7 days is the optimal condition for storage of TIA preparations without significant reduction of the therapeutic dose (not less than 95% of the encapsulated amount).

Keywords: vincristine, vinblastine, directed transport of medicinal substances, erythrocyte carriers, degree of hemolysis of erythrocytes.

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

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

* адресат для переписки:

E-mail: trineevaov@mail.ru

Тел.: 8 (473) 253 07 89

ВВЕДЕНИЕ

Направленный транспорт лекарственных веществ – это способ модификации для улучшения их поступления в ткани-мишени [1]. Кроме того, стоимость разработки направленного транспорта известных антибактериальных и противоопухолевых препаратов в разы уступает стоимости разработки новых лекарственных средств. Это объясняется двумя причинами: во-первых, тем, что обычно в качестве носителей используются мицеллы (липосомы), наночастицы, биополимеры и аутологичные форменные элементы крови, для большинства которых вопросы биобезопасности хорошо изучены; во-вторых, «старые» препараты имеют мощное доклиническое и клиническое досье. Именно поэтому для модифицированного лекарственного средства («старый» препарат плюс носитель) чаще всего достаточ-

но проведения ограниченного изучения токсичности и эффективности [1, 2]. При этом достаточно часто за рамками исследований остаются вопросы изучения фармакокинетики модифицированных лекарственных средств [1].

В литературе имеются сведения о возможности использования клеточных носителей (КН) в качестве систем доставки различных лекарственных средств к патологически измененным органам и клеткам-мишеням. В научных публикациях пока отсутствуют сведения о применении КН для винкристина (VCR) и винбластина (VBL) – высокотоксичных противоопухолевых алкалоидов группы индола, входящих в стандарты лечения некоторых онкологических заболеваний. В связи с этим актуальным является исследование возможности применения КН для загрузки VCR и VBL с целью уменьшения побочных явлений, улучшения эффективности препарата и переносимости

химиотерапии. Особенную актуальность приобретают исследования стабильности и сроков годности модифицированного лекарственного средства.

Сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии были получены модифицированные формы известных в терапии онкологических заболеваний терпеноиндольных алкалоидов (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. При этом получали по четыре серии ЭН с загруженными ТИА-препаратами (VCR_Ery I-IV, а также VBL_Ery I-IV). Загрузку эритроцитов ТИА проводили также при наличии в среде инкубации модифицирующих агентов: апротонного растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО), полиэтиленгликолей (ПЭГ-4000, ПЭГ-400) и аденозинтрифосфата (АТФ). Данный способ модификации позволяет решить одновременно проблемы направленного транспорта данных эффективных противоопухолевых препаратов и снижения частоты и силы побочных эффектов, а следовательно, и увеличения комплаентности больных к назначенному лечению.

Цель работы – изучение стабильности клеточных носителей с включенными ТИА при хранении в различных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве ТИА-препаратов применяли винкристина сульфат и винбластин сульфат, 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 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. № Р 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. № Р N000203/01 от 18.08.06, «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия), дочерняя компания «ВЕРО-ФАРМ» (Россия)].

Для изучения стабильности клеточных носителей с включенными ТИА образцы инкубировали в Na-фосфатном буферном растворе («ПанЭко», Россия, серия 1116) при различных температурах. Стабильность ЭН с включенными ТИА определяли по высвобождению гемоглобина из эритроцитов при хранении. Степень гемолиза эритроцитов – показатель, демонстрирующий способность сохранения целостности эритроцитов при хранении. При высокой степени гемолиза эритроцитов теряется способность сохранять терапевтическую концентрацию ТИА-препаратов.

Определение степени гемолиза ТИА-инкапсулированных эритроцитов: 0,5 мл ТИА-инкапсулированных эритроцитов инкубировали в 10 мл Na-фосфатного буферного раствора при +4 °С, +10 °С и комнатной температуре. Из каждой пробы взято 8 мл супернатанта. 0,5 мл полученного супернатанта разбавляли до 10 мл Na-фосфатным буферным раствором и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм относительно 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора (спектрофотометр Hitachi U-1900, Япония).

Контрольная проба: 0,5 мл свежезолированных эритроцитов дважды промывали изотоническим раствором натрия хлорида и инкубировали их в Na-фосфатном буферном растворе при соответствующей температуре в течение 6 ч. Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$K_{(Hb)} = \frac{A_{(ТИА-ЭН)}}{A_{(КЭ)}}$$

где $K_{(Hb)}$ – степень гемолиза, $A_{(ТИА-ЭН)}$ – оптическая плотность ТИА-инкапсулированных эритроцитов, $A_{(КЭ)}$ – оптическая плотность контрольных эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, показывают, что температура и продолжительность хранения значительным образом влияют на стабильность КН, заполненных изучаемыми алкалоидами. Так, увеличение температуры в первый день хранения с +4 до +10 °С несущественно увеличивает степень гемолиза ЭН, в то время как при хранении при температуре +20 °С данный показатель возрастает в среднем в 1,5 раза относительно образцов, хранившихся при температуре +4 °С и в 1,3 раза по сравнению с контролем. Продолжительность хранения увеличивает степень гемолиза ЭН с включенными ТИА-препаратами на третьи сутки в 1,7 раза, а на шестые сутки – в 2,5 раза. Из полученных результатов видно, что хранение ТИА-инкапсулированных ЭН при температуре +4 °С в Na-фосфатном буферном растворе является оптимальным. В дальнейшем для опреде-

Таблица 1.

Степень гемолиза ТИА-инкапсулированных эритроцитарных форм при хранении в различных условиях

Форма ЭН	1 день			3 день			6 день		
	Температура, °С			Температура, °С			Температура, °С		
	4	10	20	4	10	20	4	10	20
ЭН (Ery)	1,028	1,057	1,415	1,764	1,849	2,057	2,283	2,528	3,028
VCR_EryI	1,189	1,236	1,764	1,943	2,34	2,811	2,887	3,094	3,575
VCR_Ery II	1,142	1,283	1,811	2,038	2,283	2,783	2,915	3,123	3,472
VCR_Ery III	1,208	1,264	1,849	1,981	2,255	2,811	2,84	3,283	3,698
VCR_EryIV	1,226	1,311	1,783	2,085	2,302	2,764	2,925	3,104	3,528
VBL_EryI	1,142	1,226	1,868	2,047	2,217	2,717	2,906	3,17	3,472
VBL_EryII	1,208	1,264	1,915	2,066	2,255	2,679	2,925	3,226	3,481
VBL_EryIII	1,245	1,302	1,868	1,962	2,292	2,802	3,009	3,283	3,491
VBL_EryIV	1,189	1,321	1,849	2,075	2,245	2,698	2,972	3,198	3,604

Примечание: *Abs – контрольная проба – 0,109. Здесь и далее: VCR_Ery и VBL_Ery – эритроцитарные формы препаратов, полученные в немодифицированной среде для инкубации.

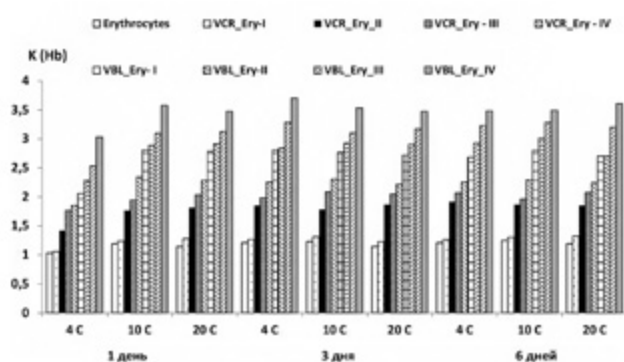


Рисунок 1. Гистограмма степени гемолиза ТИА-инкапсулированных эритроцитарных форм при хранении в различных условиях

ления возможного срока хранения рассматривались только образцы ТИА-ЭН, содержащиеся в холодильнике при температуре +4 °С (рисунок 2). Степень гемолиза определяли методом, описанным выше. Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2. Полученные данные об интенсивности роста степени

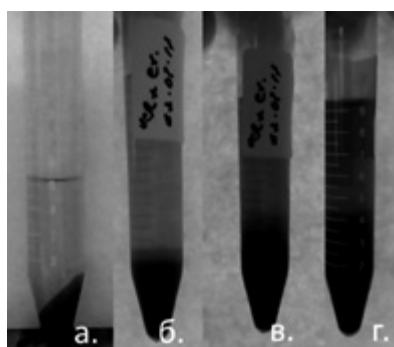


Рисунок 2. Степень гемолиза VCR-инкапсулированных эритроцитов после хранения в Na-фосфатном буферном растворе с pH=7,4 при температуре +4 °С: а) после получения образца; б) после 1 недели хранения; в) после 3 недель хранения; г) после 4 недель хранения

гемолиза за наблюдаемый период показали возможность хранения ТИА-ЭН до двух недель. Наблюдения за стабильностью исследуемых объектов продемонстрировали, что хранение в течение четырех недель приводило к увеличению степени гемолиза более чем в 10 раз.

Таблица 2.

Степень гемолиза ТИА-инкапсулированных эритроцитарных форм при хранении при +4 °С

Эритроцитарная форма	Время хранения (недели)			
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
ЭН (Ery)	1	1,4444	3,2556	10,3259
VCR_Ery-I	1,0963	1,7296	4,3926	11,7963
VCR_Ery_II	1,1259	1,6963	4,5037	11,6889
VCR_Ery – III	1,1481	1,7481	4,6111	12,0704
VCR_Ery – IV	1,1037	1,6407	4,5370	14,0111
VBL_Ery_I	1,1481	2,2148	5,0667	14,7630
VBL_Ery_II	1,1704	2,2519	5,0963	14,5444
VCR-PEG-4000_1:5	1,0185	1,9889	4,1778	11,1741
VCR-PEG-4000_1:10	1,0407	2,0074	4,2185	11,3259
VCR-PEG-4000_1:20	1,0481	2,0407	4,4667	11,4407
VCR-PEG-4000_1:50	1,0667	2,1000	4,5889	11,7296
VCR-PEG-4000_1:100	1,1037	2,1926	4,5259	12,1296
VBL-PEG-4000_1:10	1,0222	1,9963	4,6148	12,5444
VBL-PEG-4000_1:20	1,0407	2,0333	4,7481	11,1667
VBL-PEG-400_1:20	1,0481	2,0037	4,4111	11,5259
VBL-PEG-4000_1:50	1,1074	2,2148	4,7370	12,1667
VBL-PEG-4000_1:100	1,1185	2,2370	4,8222	12,4630
VCR_ATP	1,1037	2,5704	5,3852	13,3630
VBL_ATP	1,1333	2,6222	5,563	13,9852
VCR_DMSO	1,0704	2,1333	5,1556	11,5148
VBL_DMSO	1,0593	2,1556	5,1926	11,7889

Примечание: *Abs – контрольная проба – 0,270. Здесь и далее: VCR-PEG и VBL-PEG – эритроцитарные формы препаратов, полученные в среде инкубации, модифицированной ПЭГ; VBL и VCR_DMSO – эритроцитарные формы препаратов, полученные в среде инкубации, модифицированной ДМСО; VBL и VCR_ATP – эритроцитарные формы препаратов, полученные в среде инкубации, модифицированной АТФ.

Для оценки количественного содержания VCR и VBL в исследуемых образцах было проведено их определение по ранее разработанной и валидированной спектрофотометрической методике. Результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 3. Полученные результаты обобщены в таблице 4 и на рисунке 4 (а-г). При хранении до 7 суток количественное содержание ТИА-препаратов в ЭН снижается постепенно. После 3 дней хранения ЭН при температуре +4 °С остаточное содержание инкапсулированной дозы препаратов в среднем составляет 98,54%; после 7 дней хранения – 95,96%, резко снижаясь к 14-му дню хранения до 24,78%. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ТИА-инкапсулированные ЭН можно хранить при температуре +4 °С до 7 дней без значительного снижения терапевтической дозы (не ниже 95% от инкапсулированных ТИА-препаратов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, показывают, что выдерживание ТИА-инкапсулированной эритроцитарной формы при +4 °С

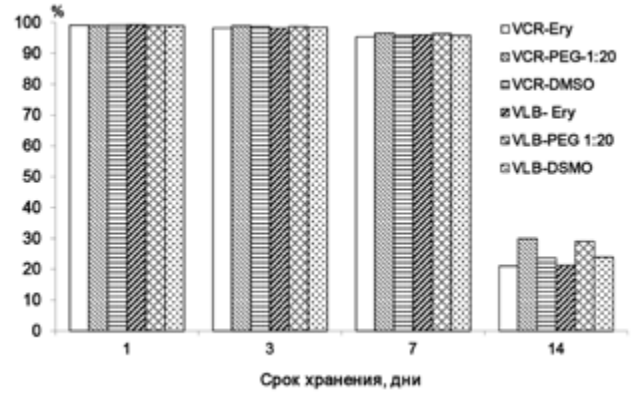


Рисунок 3. Графическое представление количественного содержания инкапсулированных ТИА после хранения образцов при температуре +4 °С

является оптимальным условием для хранения ТИА-препаратов. При хранении количественное содержание ТИА-препаратов в эритроцитах изменяется. Установлено, что после 3 дней хранения ЭН при температуре +4 °С остаточное содержание инкапсулирован-

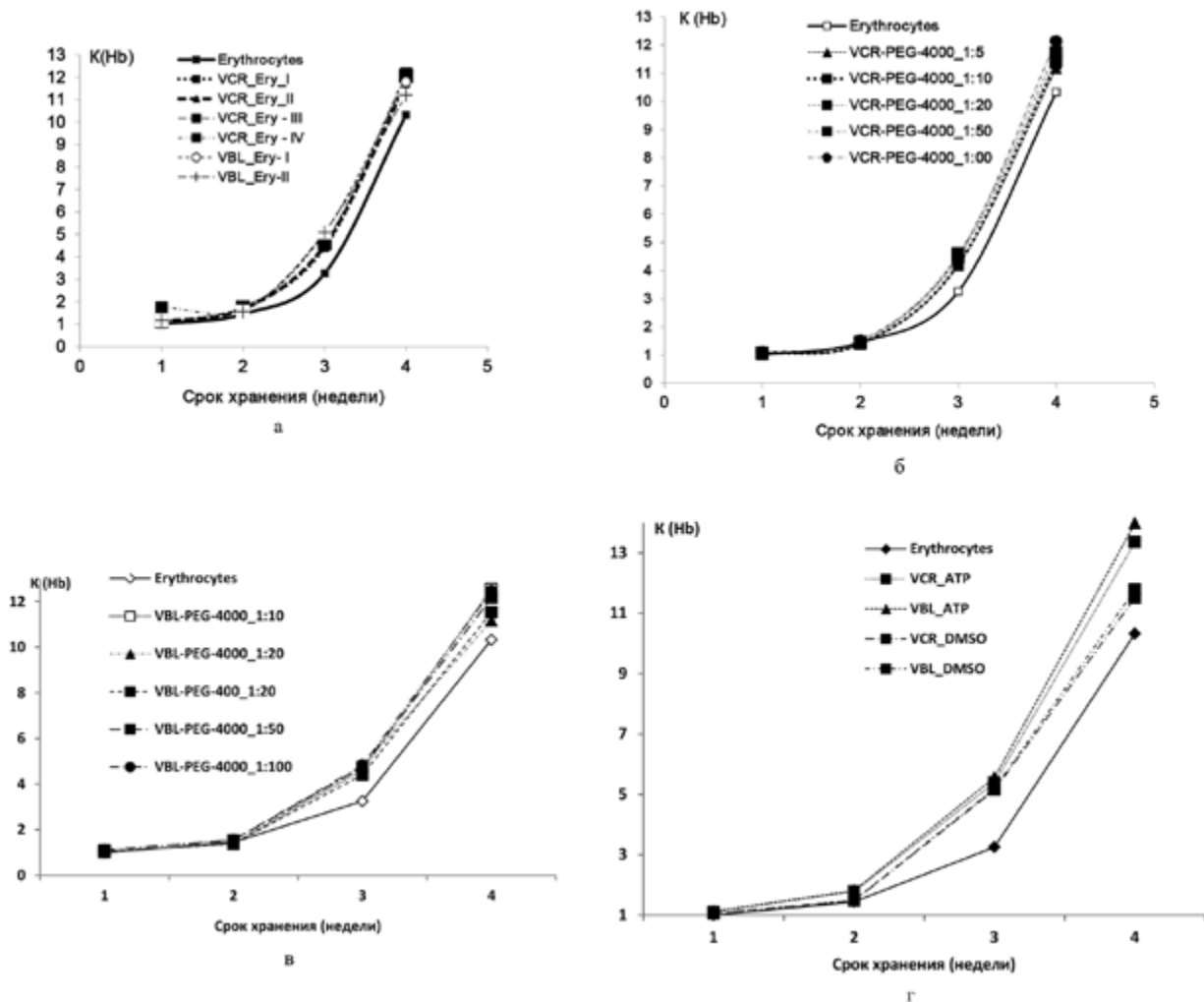


Рисунок 4. Степень гемолиза ТИА-инкапсулированных ЭН при хранении при температуре +4 °С в течение 4 недель

ной дозы препаратов в среднем составляет 98,535%; после 7 дней хранения – 95,964%, резко снижаясь к 14-му дню хранения до 24,780%. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что ТИА-инкапсулированные ЭН можно хранить при температуре +4 °С до 7 дней без значительного снижения терапевтической дозы (не ниже 95% от инкапсулированных ТИА-препаратов).

Таблица 3.

Количественное содержание инкапсулированных ТИА после хранения образцов при температуре +4 °С

Эритроцитарные формы препарата	Инкапсулированное количество ТИА (мкг)	Температура хранения +4 °С			
		Дни хранения			
		1	3	7	14
Найдено препаратов после хранения, %					
VCR-ЭН I	873,475	99,109	-	-	-
VCR-ЭН II	846,866	-	98,180	-	-
VCR-ЭН III	859,277	-	-	95,314	-
VCR-ЭН IV	893,068	-	-	-	20,985
VCR-ПЭГ-1:20	1078,869	99,011	-	-	-
VCR-ПЭГ-1:20	1026,908	-	98,927	-	-
VCR-ПЭГ-1:20	1059,131	-	-	97,502	-
VCR-ПЭГ-1:20	1024,685	-	-	-	29,913
VCR-ДМСО	1246,908	99,194	-	-	-
VCR-ДМСО	1179,731	-	98,721	-	-
VCR-ДМСО	1248,668	-	-	97,059	-
VCR-ДМСО	1206,786	-	-	-	23,657
VBL-ЭН I	891,733	99,288	-	-	-
VBL-ЭН II	871,727	-	98,193	-	-
VBL-ЭН III	911,738	-	-	95,969	-
VBL-ЭН IV	906,678	-	-	-	21,313
VBL-ПЭГ 1:20	1057,178	99,013	-	-	-
VBL-ПЭГ 1:20	1091,378	-	98,695	-	-
VBL-ПЭГ 1:20	1089,116	-	-	97,376	-
VBL-ПЭГ 1:20	1096,543	-	-	-	28,990
VBL-ДМСО	1291,731	98,950	-	-	-
VBL-ДМСО	1269,173	-	98,494	-	-
VBL-ДМСО	1209,156	-	-	97,190	-
VBL-ДМСО	1245,867	-	-	-	23,941

Примечание: *Количества ТИА-препаратов, применяемых для инкапсулирования – 2000 мкг.

Таблица 4.

Рекомендуемые сроки годности ЭН с ТИА-препаратами при различных режимах хранения

Вид эритроцитарной формы	Температура хранения, °С			
	4	4	10	20
	Рекомендуемый срок хранения, дни	Максимальный срок хранения, дни		
Свободные ЭН	7	10	7	1
VCR-ЭН	3	7	3	-
VCR-ПЭГ-1:20	3	7	3	-
VCR-ДМСО	3	7	3	-
VBL-ЭН	3	7	3	-
VBL-ПЭГ-1:20	3	7	3	-
VBL-ДМСО	3	7	3	-

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Заборовский, К.Г. Гуревич. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть I. Однократное введение // Сибирский онкологический журнал. 2017. № 1(16). С. 59–65.
2. А.В. Заборовский, К.Г. Гуревич. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть II. Многократное введение // Сибирский онкологический журнал. 2017. Т. 16. № 2. С. 36–41.
3. О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин, Е.Е. Чупандина. Морфологические и физико-химические свойства эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 146–151.