

ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФОРМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ВИНКРИСТИНА И ВИНБЛАСТИНА

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

Воронежский государственный университет;

Российская Федерация, 394006, Воронеж, Университетская пл., д. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Халахакун Мудиянселаге Амила Дживанта – аспирант фармацевтического факультета Воронежского государственного университета (ВГУ). Тел.: +7 (950) 774-86-03. E-mail: amilajh1982@hotmail.com

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

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

Чупандина Елена Евгеньевна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой управления и экономики фармации и фармакогнозии, первый проректор – проректор по учебной работе ВГУ. Тел.: +7 (920) 211-64-39. E-mail: chupandina@pharmvsu.ru.

Введение. В онкологической практике химиотерапия по-прежнему актуальна. Возможности «старых» лекарственных средств полностью не исчерпаны. При разработке направленного транспорта новых противоопухолевых лекарственных средств и их дальнейшем внедрении в практику особое значение имеет изменение их фармакокинетики, что является основой при подборе режимов дозирования.

Цель работы – исследование возможности получения иммобилизованных клеточных форм противоопухолевых препаратов винкристина и винбластина для осуществления направленного транспорта данных лекарственных веществ в организме.

Материал и методы. Исследовали препараты терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина различных производителей. Для получения эритроцитарной клеточной формы препаратов использовали модифицированный метод гипоосмотического лизиса. Эффективность инкапсулирования препаратов в эритроцитах устанавливали спектрофотометрически.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о довольно близкой степени включения исследуемых веществ в эритроцитарные носители. Обнаружено, что на эффективность включения винкристина и винбластина в эритроциты влияет время хранения изолированных эритроцитов.

Заключение. Показана возможность получения иммобилизованных клеточных форм противоопухолевых препаратов винкристина и винбластина для осуществления направленного транспорта. Но существующий технологический процесс получения инкапсулированных форм препаратов сопровождается их значительными потерями. Поэтому весьма актуальна разработка методики для увеличения эффективности инкапсуляции винкристина и винбластина.

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

Для цитирования: Халахакун А.Д., Тринеева О.В., Сливкин А.И., Чупандина Е.Е. Получение иммобилизованных клеточных форм противоопухолевых препаратов винкристина и винбластина. Фармация, 2018; 67 (4): 23–28. DOI: 10.29296/25419218-2018-04-05.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на развитие методов ранней диагностики, хирургии, лучевой терапии и других, в онкологической практике химиотерапия по-прежнему будет актуальна в ближайшее время. Поэтому разработка и стандартизация новых противоопухолевых препаратов остается одной из актуальных задач современной фармацевтической химии. При всей важности поиска новых соединений с противоопухолевой активностью следует

подчеркнуть, что возможности «старых» средств полностью не исчерпаны. Направленный транспорт противоопухолевых лекарственных веществ может подарить им «вторую жизнь» в клинике. Стоимость разработки направленного транспорта известных противоопухолевых препаратов гораздо ниже стоимости разработки новых лекарственных средств (ЛС) [1]. Это объясняется 2 причинами: во-первых, в качестве носителей обычно используются мицеллы (липосомы), наночастицы, био-

полимеры и аутологичные форменные элементы крови, для большинства которых вопросы биобезопасности хорошо известны; во-вторых, «старые» препараты имеют огромный опыт доклинического и клинического применения. Именно поэтому для модифицированного ЛС («старый» препарат плюс носитель) чаще всего достаточно проведения ограниченного изучения токсичности и эффективности [1,2]. При разработке направленного транспорта ЛС и их дальнейшем внедрении в практику особое значение имеет изменение их фармакокинетики, что является основным в подборе режимов дозирования.

Цель работы – исследование возможности получения иммобилизованных клеточных форм противоопухолевых препаратов винкристина и винбластина для осуществления направленного транспорта данных лекарственных веществ в организме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследований – препараты терпеноиндольных алкалоидов (ТИА) – винкристина (VCR) сульфат («Винкристин-Тева»), производитель «Teva Pharmaceutical Industries Ltd», Израиль; «VERO-винкристин», производитель «ЛЭНС-ФАРМ», Россия; «Винкристин-Рихтер», производитель «Gedeon Richter Ltd», Венгрия; и винбластина (VBL) сульфат («Винбластин-LANS®»), производитель «ЛЭНС-ФАРМ», Россия. Указанные препараты соответствуют требованиям действующей нормативной документации Российской Федерации.

Включение препаратов ТИА в клеточные носители. Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VBL использован модифицированный метод гипоосмотического лизиса. Для этого 1,0 мл изолированных эритроцитов из свежезятой крови донора дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 мин при +4°C. Для предварительного набухания к 1,0 мл эритроцитов добавляли 4,0 мл 0,65% гипоосмотического раствора натрия хлорида, охлажденного до 0°C. Полученную суспензию клеток инкубировали при 0°C в течение 5 мин и после этого центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 мин (рис. 1), супернатант отбрасывался. К полученной клеточной массе добавляли 8,0 мл изучаемого VCR и VBL (125, 250, 275 мкг/мл), растворенных в охлажденной до 0°C воде очищенной. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 4°C, затем добавляли 1/9 объема (1,0 мл) 9,0% раствора натрия хлорида для восстановления целостности мембраны эритроцитов и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. После включения препарата в эритроциты последние дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида, затем осаждали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Полученные эритроцитарные формы препаратов хранили с добавлением 1,0 мл Na-фосфатного буферного раствора (pH=7,4) с 3,0% декстраном в холодильнике при температуре +4°C.

Определение эффективности инкапсулирования препаратов ТИА в эритроцитах. При получении иммобилизованных эритроцитарных лекарственных форм VCR и VBL наиболее важный показатель – эффективность включения (инкапсулирования) препаратов в эритроциты. Эффективность включения (E, %) можно математически выразить формулой:

$$E, \% = \frac{m \cdot 100\%}{M}$$

где m – количество (мг, мкг), инкапсулированных препаратов ТИА; M – количество (мг, мкг), инкубированных препаратов ТИА.

Для обнаружения и количественного определения VCR и VBL применяли УФ-

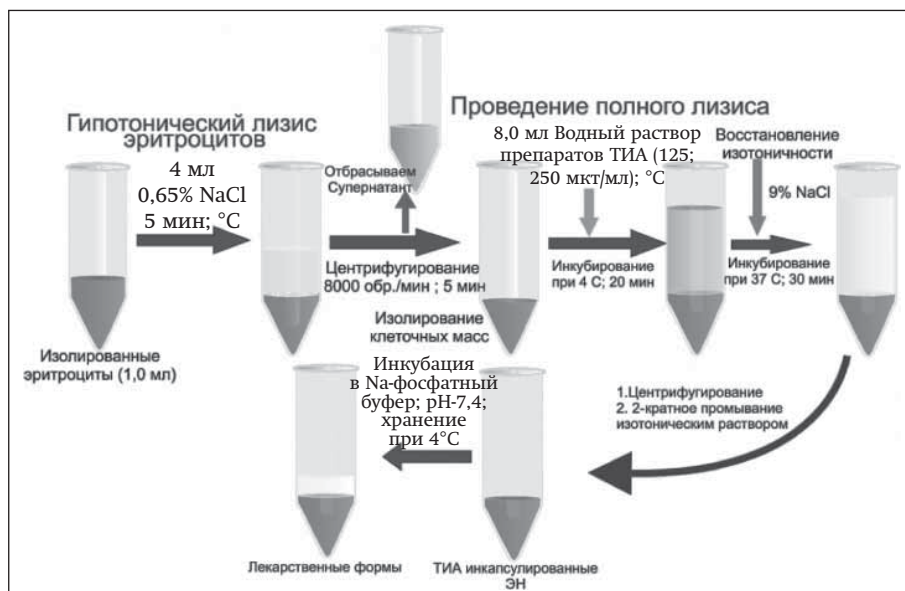


Рис. 1. Метод инкапсулирования препаратов терпеноиндольных алкалоидов (ТИА) в эритроцитарные носители (ЭН)

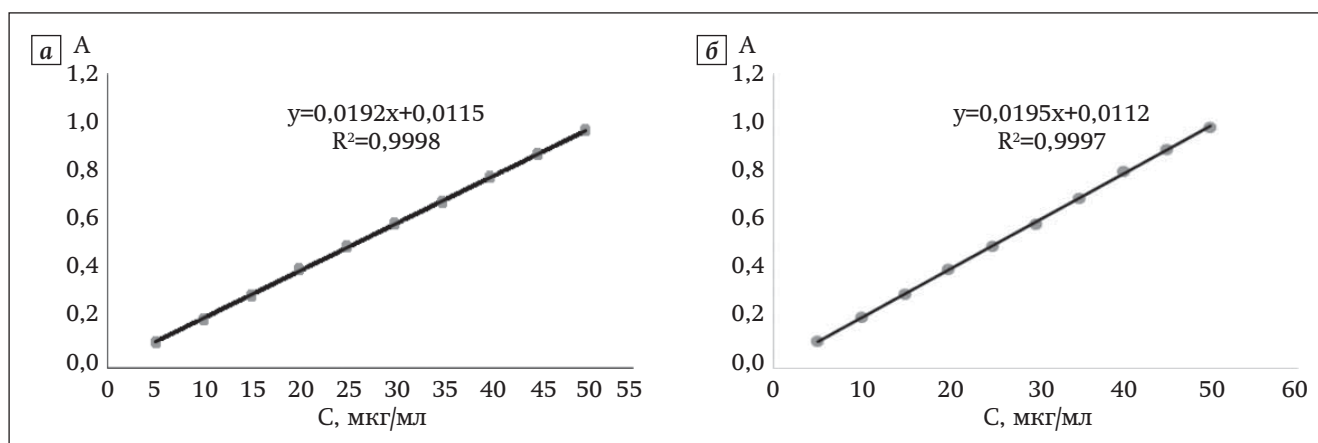


Рис. 2. Линейная зависимость величины оптической плотности раствора от содержания:
 а – VBL сульфата ($\lambda_{\max}=268$ нм); б – VCR сульфата ($\lambda_{\max}=295$ нм)

спектральные характеристики данных препаратов и использовали ранее описанную и валидированную спектрофотометрическую методику [3, 4].

Методика количественного определения клеточных форм препаратов ТИА. Для получения

эритроцитарных лекарственных форм препаратов ТИА использовали 1,0 мл изолированных человеческих эритроцитов и соответствующую терапевтическую дозу препаратов. При этом 1,0 мл изолированных эритроцитов инкубировали с

Таблица 1

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЯХ

№ колонки	Эритроциты для инкапсулирования	Взято для инкубирования, мкг	Инкапсулировано препаратов, мкг	Эффективность загрузки, E (%)	Метрологические характеристики результата (p=95%)
VCR					
I	После 1 нед изолирования	1100	385,271	35,025	$\bar{X}=32,449\%$; SD=2,1739%; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}=32,449 \pm 3,4566\%$; $\xi=21,304\%$
II	После 2 нед изолирования	1100	365,741	33,249	
III	После 3 нед изолирования	2100	662,342	31,540	
IV	После 4 нед изолирования	2200	659,639	29,984	
I	Свежеизолированные	1100	467,932	42,539	$\bar{X}=42,963\%$; SD=2,482%; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}=42,963 \pm 3,946\%$; $\xi=18,368\%$
II		1100	435,847	39,622	
III		2100	944,816	44,991	
IV		2200	983,417	44,701	
VBL					
I	После 1 нед изолирования	1500	511,968	34,131	$\bar{X}=31,215\%$; SD=3,5026%; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}=31,215 \pm 5,5692\%$; $\xi=35,682\%$
II	После 2 нед изолирования	1500	500,449	33,363	
III	После 3 нед изолирования	2000	620,323	31,016	
IV	После 4 нед изолирования	1500	395,280	26,352	
I	Свежеизолированные	1000	426,568	43,568	$\bar{X}=44,266\%$; SD=2,4315%; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}=44,266 \pm 3,866\%$; $\xi=17,4674\%$
II		1500	618,527	41,235	
III		2000	937,519	46,876	
IV		2000	907,690	45,384	

Примечание. Здесь и в табл. 2 колонки отличались высотой слоя сорбента, скоростью сбора элюента и объемом подвижной фазы.

1,0; 1,5; 2,0; 2,2 мг препаратов VCR и VBL. Количественное содержание инкапсулированных препаратов в полученных эритроцитарных лекарственных формах определяли разработанным методом для количественного определения препаратов ТИА в биоматериале [3] с применением гель-хроматографии [4–7]. Для чего 1,0 мл лекарственной формы, представляющей собой клеточные носители с инкапсулированными препаратами ТИА (VCR и VBL), подвергали гемолизу путем двукратного замораживания и размораживания. Затем добавляли 7-кратное количество воды очищенной, смесь центрифугировали в течение 10 мин при скорости 5000 об/мин. Полученный гемолизат и осадочную жидкость отдельно кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Затем охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм. К полученному фильтрату прибавляли 2 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали и вновь центрифугировали 5 мин при 8000 об/мин. Супернатант собирали в чистую пробирку, нейтрализовали и количественно перенося-

ли в колонку с сефадексом G-25, предварительно уравновешенную водой очищенной. Супернатант элюировали водой очищенной, собирая до 12 фракций по 2,0 мл. Оптическую плотность полученных фракций измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения VCR и VBL при соответствующей длине волны в кювете с толщиной слоя 1 см. Содержание лекарственных веществ рассчитывали по уравнениям калибровочных графиков (рис. 2) с использованием поправочного коэффициента для конкретной колонки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные, (табл. 1, 2, 3) свидетельствуют о довольно близкой степени включения исследуемых веществ VCR и VBL в эритроцитарные носители (ЭН). Кроме того, обнаружено, что на эффективность включения препаратов ТИА в эритроциты влияет время хранения изолированных ЭН. «Старые» эритроциты показывали значительно меньшую эффективность инкапсуляции препаратов ТИА по сравнению со свежеизолированными.

Таблица 2

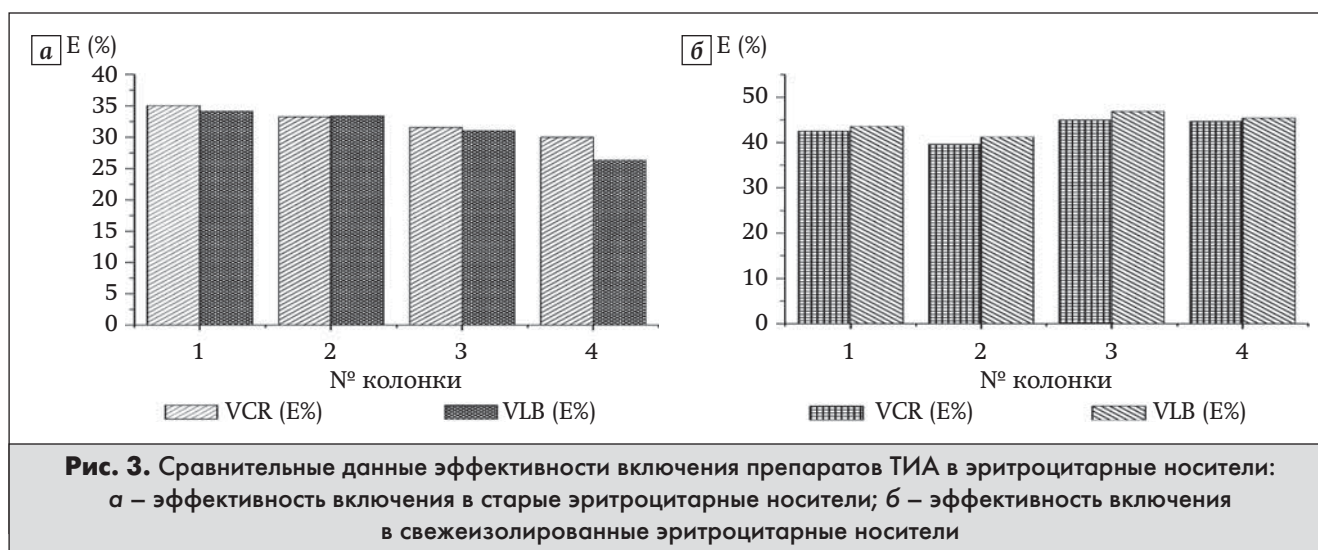
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРЕПАРАТОВ В НАДОСАДОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

№ колонки	Эритроциты для инкапсулирования	Взято для инкубирования, мкг	Найдено в гемолизате, мкг	Количество несвязавшегося ТИА, %	Метрологические характеристики результата (p=95%)
VCR					
I	После 1 нед изолирования	1100	706,259	64,205	$\bar{X}=66,753\%$; $SD=2,0956\%$; $\bar{X} \pm \Delta \bar{x}=66,753 \pm 3,332\%$; $\xi=9,983\%$
II	После 2 нед изолирования	1100	726,654	66,059	
III	После 3 нед изолирования	2100	1421,489	67,690	
IV	После 4 нед изолирования	2200	1519,327	69,060	
I	Свежеизолированные	1100	625,325	56,848	$\bar{X}=55,938\%$; $SD=2,6483\%$; $\bar{X} \pm \Delta \bar{x}=55,938 \pm 4,211\%$; $\xi=15,055\%$
II		1100	651,924	59,266	
III		2100	1124,387	53,542	
IV		2200	1190,081	54,095	
VBL					
I	После 1 нед изолирования	1500	979,206	65,280	$\bar{X}=67,422\%$; $SD=3,3819\%$; $\bar{X} \pm \Delta \bar{x}=67,422 \pm 5,377\%$; $\xi=15,951\%$
II	После 2 нед изолирования	1500	985,031	65,669	
III	После 3 нед изолирования	2000	1325,649	66,282	
IV	После 4 нед изолирования	1500	1086,862	72,457	
I	Свежеизолированные	1000	562,976	56,298	$\bar{X}=54,576\%$; $SD=2,6771\%$; $\bar{X} \pm \Delta \bar{x}=54,576 \pm 4,257\%$; $\xi=15,599\%$
II		1500	859,674	57,312	
III		2000	1032,028	51,601	
IV		2000	1061,857	53,093	

**СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВКЛЮЧЕНИЯ
ПРЕПАРАТОВ ТИА В ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ НОСИТЕЛИ**

Эритроциты для инкапсулирования	Эффективность включения препарата, E, %*	Практическое содержание в гемолизате, %*	Общее найденное количество препарата, %*	Потеря препарата, %
VCR				
После изолирования 1–4 нед	32,449±2,174	66,753±2,096	99,202	0,798
Свежеизолированные	42,963±2,648	55,938±4,211	98,901	1,099
VBL				
После изолирования 1–4 нед	31,215±3,503	67,422±3,382	98,637	1,363
Свежеизолированные	44,266±2,432	54,576±2,677	98,842	1,158

Примечание. * – представлены средние значения, ± среднеквадратичные отклонения



В эксперименте обнаружено, что содержание неинкапсулированных препаратов ТИА в надосадочной жидкости довольно высоко (см. табл. 2, 3; рис. 3). Следовательно, в технологическом процессе получения инкапсулированных ТИА в ЭН потери препарата будут значительны. С экономической и технологической точек зрения это невыгодно, поэтому разработка методики для увеличения эффективности инкапсуляции препаратов ТИА является актуальным направлением исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о довольно близкой степени включения исследуемых веществ в эритроцитарные носители. Эффективность включения при использовании эритроцитов после 1–4 нед хранения значительно уменьшается и составляет в среднем 32,45% – для VCR и

31,22% – для VBL. Эффективность включения VCR в свежеизолированные эритроциты составляет, в среднем 42,96%, а VBL – 44,27%. Согласно этим показателям, эффективность загрузки ТИА значительно повышается при использовании свежеизолированных эритроцитов.

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; 1 (16): 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.

3. Халахакун А.Д. и др. Установление оптимальных условий для стандартизации винкристина методом спектрофотометрии. Материалы VI Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ». Воронеж: ВГУ, 2016; 570–5.

4. Ó'Fágáin C., Cum-mins P.M., O'Connor B.F. Gel-Filtration Chromatography. «Protein Chromatography Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology» (by 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. Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А., Лопухов Л.В., Зайнуллин Л.И. Хроматографические методы очистки белков. Казань: КФУ, 2013; 1–48.

Поступила 19 января 2018 г.

TO PREPARE THE IMMOBILIZED CELL FORMULATIONS OF THE ANTICANCER DRUGS VINCRISTINE AND VINBLASTINE
A.D. Khalakhakun, O.V. Trineeva, A.I. Slivkin, E.E. Chupandina
Voronezh State University; 1, Universtitetskaya Sq., Voronezh 394006, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHOS

Halakhakun A. Jeewantha – Ph.D. student, Department of Pharmaceutical faculty, Voronezh State University, Voronezh. Tel.: +7. E-mail: amilajh1982@hotmail.com

Trineeva Olga Valeryevna – doctor of pharmaceutical sciences, associate professor of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty of VGU.

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

Chupandina Elena Evgenievna – doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager chair of department of management and economics of pharmacy and pharmacognosy, first vice-rector – vice-rector for academic affairs of VSU. Tel.: +7. E-mail: chupandina@pharmvsu.ru.

SUMMARY

Introduction. Chemotherapy is still relevant in cancer practice. The potentials of old drugs are not completely exhausted. When developing the targeted transport of novel anticancer drugs and their further introduction into practice, it is particularly important to change their pharmacokinetics, which is the basis for the selection of dosage regimens.

Objective: to investigate the possibilities of preparing the immobilized cell formulations of the anticancer drugs vincristine and vinblastine for their targeted transport in the body.

Material and methods. The terpenoid indole alkaloids vincristine and vinblastine from different manufactures were studied. The modified hypoosmotic lysis method was used to prepare a packed red blood cell formulation of the drugs. The efficiency of drug encapsulation in red blood cells was established spectrophotometrically.

Results. The findings suggest that there is a fairly close degree of including the studied substances in red blood cell carriers. The shelf-life of isolated red blood cells has an impact on the efficiency of including vincristine and vinblastine in red blood cells.

Conclusion. The study has shown the possibility of preparing the immobilized cell formulations of the anticancer drugs vincristine and vinblastine for their targeted transport. But the existing technology for encapsulated drugs is accompanied by significant losses of a drug. Therefore, it is very important to develop a procedure to enhance the efficiency of encapsulation of vincristine and vinblastine.

Key words: vincristine; vinblastine; efficiency of inclusion; red blood cell carriers; targeted transport of drug substances.

For citation: Khalakhakun A.D., Trineeva O.V., Slivkin A.I., Chupandina E.E. to prepare the immobilized cell formulations of the anticancer drugs vincristine and vinblastine. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 67 (4): 23–28. DOI: 10/29296/25419218-2018-04-05

REFERENCES

1. Zaborovskij A.V., Gurevich K.G. Modeling of directional transport of medicinal substances. Part I. Single entry. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*, 2017; 16 (1): 59–65 (in Russian).

2. Zaborovskij A.V., Gurevich K.G. Modeling of directional transport of medicinal substances. Part II. Multiple introduction. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*, 2017; 16 (2): 36–41 (in Russian).

3. Khalakhakun A.D. et al. Establishment of optimal conditions for standardization of vincristine by spectrophotometry. Материалы VI Mezhdunarodnoy nauchno-metodicheskoy konferencii «Puti i formy sovershenstvovaniya farmaceuticheskogo obrazovaniya. Sozdanie novykh fiziologicheskii aktivnykh veshchestv». Voronezh: VGU, 2016; 570–3 (in Russian).

4. Ó'Fágáin C., Cum-mins P.M., O'Connor B.F. Gel-Filtration Chromatography. «Protein Chromatography Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology» (by 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. Ibragimov A.N., Bikmullin A.G., Sataeva D.A., Lopuhov L.V., Zajnullin L.I. Chromatographic methods for protein purification. Kazan: KFU, 2013; 1–48 (in Russian).