N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 5, Number 317 (2016), 85 – 93

A. Shramko, D. Ibrasheva, D. Idrissova, B. Umbayev,
B. F. Olzhayev, K. Berikkhanova, A. Gulyayev, Sh. Askarova

National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan.
E-mail: alla.shramko@nu.edu.kz

APPLICATION OF ERYTHROCYTES' GHOSTS FOR TARGETED DELIVERY OF IMMUNE MODULATING PEPTIDES INTO LIVER

Abstract. The overall aim of this research is to investigate a possibility of using erythrocytes' ghosts (pharmacocytes) for liver-targeted delivery of immune modulating peptide pegylated IFN α–2b. We have applied different methods of drug encapsulation: hypo-osmotic hemolysis method, hypotonic pre-swelling method and dialysis method. Dialysis method was found to be the most effective for drug encapsulation into erythrocytes' ghosts, and effectiveness of encapsulation increased with the lower doses of IFN α–2b. For the pharmacokinetic study, single IV injections of either free or encapsulated IFN α–2b were made and the concentration of IFN α–2b in serum samples and tissue homogenates were determined. Encapsulation in erythrocytes' ghosts improved pharmacokinetic profiles of IFN α–2b by increasing the half-life, reducing its clearance, and increasing the deposition of the drug in the liver and spleen – the organs abundant in cells of the reticuloendothelial system. These data support the hypothesis that the erythrocytes' ghosts are effective drug carriers for liver-targeted delivery of immune modulating peptides.

Keywords: targeted delivery, viral hepatitis, erythrocytes' ghosts, pegylated IFN α–2b.

УДК 615.032

А. Шрамко, Д. Ибрашева, Д. Идрисова, Б. Умбаев,
Ф. Олжаев, К. Берикханова, А. Гуляев, Ш. Аскарова

"National Laboratory Astana", Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В ПЕЧЕНЬ

Аннотация. Цель исследования – изучение возможности использования теней эритроцитов (фармакоцитов) в качестве носителей иммунорегуляторного пептида пегилированного ИФН α–2b для целенаправленной доставки в печень. В ходе исследования были использованы различные методы инкапсуляции лекарственных препаратов: метод гипоосмического гемолиза, метод гипотонического пресвеллинга и диализный метод. В результате проведенных исследований диализный метод был признан наиболее оптимальным методом загрузки лекарственных препаратов в фармакоциты; при этом эффективность включения ИФН α–2b увеличивалась с использованием более низких концентраций. Для изучения фармакокинетики производили разовую внутривенную инъеккцию свободного или инкапсулированнорго в фармакоциты ИФН α–2b и измеряли концентрацию препарата в сыворотке крови и гомогенатах внутренних органов. Было показано, что включение ИФН α–2b в тени эритроцитов улучшало его фармакокинетику путем увеличения периода полувыведения, снижения клиренса препарата и перераспределения в организме с максимальным накоплением в тканях печени и селезёнки – органах, содержащих наибольшее количество клеток ретикулоэндотелиальной системы. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что тени эритроцитов, наполненные имму-

норегуляторными пептидами являются эффективными системами целенаправленной доставки лекарственных средств в печень.

Ключевые слова: целенаправленная доставка, вирусные гепатиты, тени эритроцитов, пегилированный интерферон α– 2b.

Введение. Гепатиты В и С являются потенциально опасными для жизни инфекционными заболеваниями, которые широко распространены во всех промышленно развитых странах, включая Казахстан. По данным ВОЗ, на данный момент два миллиарда человек во всем мире инфицированы вирусом гепатита В (HBV) (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/), и около 150 миллионов человек инфицированы вирусом гепатита С (HCV) (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/). У 20% инфицированных людей развивается хроническая инфекция, что приводит к высокому риску развития цирроза печени и/или рака печени. Ежегодно около 600 000 человек умирают из-за последствий гепатита В, и более 350 000 человек – из-за последствий гепатита С. Несмотря на то, что существует множество способов лечения острой формы вирусного гепатита, болезнь остается клинической проблемой. Лечение HBV и HCV требует длительного системного (парентерального и перорального) введения противовирусных препаратов и иммуностимулирующих средств, что зачастую вызывает серьезные побочные эффекты, которые приводят к преждевременному прекращению терапии и развитию резистентности вируса [1].

Существующие на данный момент методы лечения HBV заключаются в применении иммуномодуляторов (ИМ) в комбинации с аналогами нуклеозидов (АН) [2-4]. ИМ, используемые для лечения HBV: интерферон альфа (ИФН- α), интерферон альфа 2b (ИФН α-2b), пегилированный ИФН α-2b и тимозин α1 (Tα1). Целью ИМ-терапии является усиление регулируемого Т-лимфоцитами HBV/HCV специфического иммунного ответа, который помогает иммунной системе защитить человека от вирусной инфекции. АН направлены на подавление деятельности обратной транскриптазы/ДНК-полимеразы. Наиболее распространенным методом лечения пациентов с диагнозом HCV является применение пегилированного ИФН-2а в сочетании с рибавирином [5-8].

Эффективность анти-HBV и анти-HCV препаратов в значительной степени зависит от их фармакокинетики, в частности, их распространения и накопления в печени. С этой точки зрения, целенаправленная доставка лекарств в печень является одним из наиболее перспективных подходов для улучшения результатов лечения вирусных гепатитов [3, 9]. С одной стороны, это может существенно снизить токсичность препаратов из-за более низкой терапевтической дозы и пониженной концентрации в крови. С другой стороны, целенаправленная доставка лекарственных средств может увеличить их терапевтический эффект за счет более высокой концентрации в пораженной печени [10].

Ранее сообщалось, что при введении некоторых химиотерапевтических средств и антибиотиков, инкапсулированных в тени эритроцитов (фармакоциты), происходило повышенное аккумулирование этих препаратов в печени и селезенке [11]. Такое повышенное накопление связано с жизненным циклом эритроцитов. Как правило, они циркулируют в периферической крови около 120 дней, и после старения или повреждения, эритроциты распознаются, фагоцитируются и разрушаются тканевыми макрофагами в основном в печени, селезенке и костном мозге [12-14]. Исходя из этого, было сделано предположение, что тени эритроцитов могут быть эффективными транспортными системами для целенаправленной доставки противовирусных лекарств при лечении острого и хронического гепатита. В данном исследовании мы изучали фармакоциты в качестве носителей пегилированного интерферон α– 2b (пегилированный ИФН α–2b) для целенаправленной доставки в печень.

Материалы и методы исследования. Пегилированный ИФН α–2b (торговое название ПегИнтрон® (Schering – Plough)), лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций и растворитель в шприц – ручке (редипен), содержащий 100 мкг пегилированного ИФН α–2b в 0,5 мл раствора для инъекций.

Инкапсуляция лекарственных препаратов в ЭФ методом гипоосмического гемолиза. Для включения лекарственного препарата в аутологичные ЭФ в стерильных условиях забирали 5,0 мл крови из вены в стерильную пробирку с гепарином (25 Ед/мл). Пробирку закрывали стерильной

пробкой и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин (1057 g). Надосадок был удален стерильной пипеткой. В три пробирки было внесено по 0,9 мл осадка эритроцитов. К осадку эритроцитов добавляли 5-ти кратный объём (4,5 мл) физиологического раствора и центрифугировали при тех же условиях для отмывания эритроцитов. Процедуру повторяли дважды. К осадку эритроцитов добавляли 5-ти кратный объём дистиллированной воды, охлажденной до 0°С. Полученную суспензию тщательно перемешивали, после чего центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 минут, при 4°С. Надосадок был слит. Далее к 0,9 мл ЭФ добавляли 10 мкл препарата в необходимой концентрации и 90 мкл дистиллированной воды. Полученную суспензию инкубировали в течение 15–20 минут при 4°С. После чего к смеси была добавлена 1/9 часть этого объёма (111 мкл) 10% хлористого натрия, взвесь тщательно была перемешана и помещена в термостат на 20–30 мин при 37°С. После инкубации смесь центрифугировали при 10 минут при 1000g. Клетки были трижды промыты фосфатным буферным раствором, после чего они были инкубированы в течение 30 минут при 37°С для диссоциации комплекса препарат-эритроцит. Далее образец центрифугировали 10 минут в течение 1000g, а супернатант был удален. Для оценки количества необратимо связанного лекарственного препарата ЭФ лизировали дистиллированной водой. Для этого к 1 объему ЭФ добавлялось 2 объема дистиллированной воды.

Инкапсуляция лекарственных препаратов в ЭФ методом гипотонического пресвеллинга. Для включения лекарственных препаратов в ЭФ методом гипотонического пресвеллинга использовалась модель, разработанная Rechsteiner MC [15] с некоторой модификацией Hamidi M.[16] [17]. Для этого 10 мл забранной гепаринизированной крови центрифугировали при 1000g в течение 10 минут. Супернатант был удален, а осаженные эритроциты были отмыты 3 раза фосфатным буфером. После чего к 1 мл отмытых эритроцитов добавляли 4 мл гипотонического раствора натрия хлорида (0,65%) и осторожно перемешивали. Смесь центрифугировали при 600g в течение 5 минут, а супернатант был удален. К 0,9 мл полученных эритроцитов добавили 100 мкл раствора лекарственного препарата, растворенного в дистиллированной воде либо фосфатном буфере. Для успешного включения лекарственного препарата к 1 мл полученной суспензии было добавлено 4 мл гипертонического раствора натрия хлорида (1,1%). После инкубации в течение 30 минут при 37°С смесь центрифугировали при 1000g в течение 10 минут. Затем к полученным ЭФ добавляли 10 мл фосфатного буфера, тщательно перемешивали и оставляли на 30 минут при 37°С, после чего 10 минут центрифугировали при 1000g. Данную процедуру проводили трижды. Для оценки количества необратимо связанного лекарственного препарата ЭФ лизировали дистиллированной водой – к 1 объему ЭФ добавлялось 2 объема дистиллированной воды.

Инкапсуляция лекарственных препаратов в ЭФ диализным методом. Забранная цельная венозная кровь в пробирке с гепарином либо EDTA была откручена на центрифуге в течение 10 мин при 1900g, +4С°. Плазма и лейкоциты были аспирированы, а осажденные эритроциты были дважды промыты следующим образом. К эритроцитам был добавлен рабочий раствор Hepes (10 mM Hepes, 154 mM NaCl, 5 mM глюкоза, pH 7.4) так, чтобы итоговый объем составил 14 мл. Полученный раствор центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин, 4°С, а надосадок был удален. Во время центрифугирования образцы исследуемого препарата были приготовлены в необходимых концентрациях, и к диазиному буферу (15 mM $NaHCO_3$, 15 mM NaH_2PO_4, 20 mM глюкоза, 4 mM $MgCl_2$) были добавлены 2 mM ATP - 0,121 г и 3 mM – 0,0092 г. Тем временем, диализные мешки в необходимом количестве были тщательно гидрированы в пробирках объемом 50 мл диализным буфером (без ATP, без GSH). Следует отметить, что диализный мешок был всегда гидрирован, и в течение всей процедуры находился в одной и той же пробирке объемом 50 мл с диализным буфером без ATP, без GSH. На одном конце мешка был завязан тугой узел, а непосредственно в сам мешок было внесено 900 мкл эритроцитов и 100 мкл исследуемого образца. Содержимое было сдавлено к завязанному концу диализного мешка, а на другом конце, оставив немного воздуха, было завязано 3 тугих узла. 50 мл диализного буфера с ATP и GSH было перенесено в каждую из новых пробирок объемом 50 мл, количество новых пробирок определялось количеством исследуемых концентраций лекарственного вещества. Диализные мешки были помещены в каждую из пробирок. Диализ был проведен в ротаторе в течение 1 часа и при температуре 4 °С. После диализа полученные ЭФ были перенесены из диализных мешков в новые пробирки объемом 15 мл. Затем пробирки инкубировали в течение 5 мин при 37°С. Для запаивания мембран ЭФ было