

ХАЛАХАКУН МУДИЯНСЕЛАГЕ АМИЛА ДЖИВАНТА ХАЛАХАКУН

(Демократическая Социалистическая Республика Шри-Ланка)

**ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНО-ИНДОЛЬНЫМИ
АЛКАЛОИДНЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**

14.04.02. - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва - 2018 г

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета.

Научный руководитель:

Тринеева Ольга Валерьевна, доктор фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Сипливая Любовь Евгеньевна, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Боковикова Татьяна Николаевна, доктор фармацевтических наук, начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов №1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита состоится «17» января 2019 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.001
к.х.н., доцент

Успенская Е.В.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Противоопухолевые препараты растительного происхождения винкристин и винбластин (VCR и VLB), которые относятся к терпено-индольным алкалоидам (ТИА), обладают высокой цитостатической активностью. Их низкое избирательное действие на опухоль приводит к воздействию лекарственных средств (ЛС) на многие здоровые органы и ткани в организме пациента. В противоопухолевой химиотерапевтической практике VCR и VLB применяются в моно- и комбинированных режимах и схемах при лечении различных раковых заболеваний. Несмотря на их эффективность, имеется ряд побочных эффектов, которые ограничивают применения этих препаратов. Цели современной фармацевтической науки и производства направлены на улучшение фармакокинетического профиля ТИА препаратов для: уменьшения побочного действия, создания целенаправленной доставки ТИА препаратов через контролируемые системы доставки ЛС (СДЛС), использование нанотехнологий в создании новых видов лекарственных форм (липосомальные формы, мицеллы, микрочастицы, наночастицы) и др. Актуальным направлением исследований является поиск и разработка путей уменьшения нежелательных эффектов ТИА препаратов в организме, а также улучшение переносимости и эффективности химиотерапии.

Степень разработанности темы исследования. В течение последних нескольких десятилетий технология, контролирующая доставку ЛС, существенно продвинулась, что приводит к развитию различных способов для улучшения качества доставки ЛС. При этом очень важное значение имеет разработка методик для их стандартизации и контроля качества. В литературе в настоящее время отражены основные аспекты теории и практики направленного транспорта лекарственных веществ, рассмотрены поколения лекарственных форм, с помощью которых осуществляется доставка лекарственных веществ к органу-мишени. Одними из самых эффективных и доступных для применения (безопасность, техническая простота, быстрое достижение клинических результатов при относительно низкой себестоимости проводимых процедур) представляются методы направленного транспорта ЛС, предполагающие использование аутологичных клеток крови в качестве переносчиков препаратов. Большинство рассмотренных методов пока находится на стадии разработки и некоторые методы постепенно находят практическое применение за рубежом в медицине и др. областях. Существует возможность использования клеточных носителей (КН) в качестве системы доставки VCR и VBL. В научных публикациях пока отсутствуют данные о применении КН для инкапсулирования VCR и VBL. Поэтому актуальны исследования, посвящённые возможности применения КН для уменьшения побочных эффектов, улучшения эффективности и разработки лекарственных форм доставки VCR и VBL в патологические очаги.

Цель исследования. Цель работы – получение, стандартизация и изучение свойств эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпено-индольными алкалоидными противоопухолевыми препаратами.

Задачи исследования:

1. Разработать спектрофотометрическую методику качественного и количественного определения VCR и VLB в субстанциях и лекарственных формах.
2. Получить стабильные инкапсулированные эритроцитарные формы VCR и VLB с применением модифицированного метода гипотонического лизиса с предварительным набуханием.
3. Разработать методику количественного определения VCR и VLB в клеточных формах после предварительной очистки биоматериалов с помощью гель-хроматографии, позволяющую стандартизовать их по содержанию действующего вещества.
4. Исследовать возможности увеличения эффективности «загрузки» противоопухолевых препаратов VCR и VBL при получении иммобилизованных клеточных форм данных лекарственных веществ.
5. Изучить особенности морфологии и физико-химических свойств ЭН после загрузки их ТИА.
6. Установить устойчивость клеточных форм VCR и VLB при хранении, а также степень десорбции и кинетику высвобождения ТИА в аутологичной плазме и изотоническом буфере.
7. Определить оптимальные условия и сроки хранения полученных клеточных эритроцитарных форм VCR и VLB.

Научная новизна. Разработанной модифицированной методикой гипоосмотического лизиса были впервые получены клеточные (эритроцитарные) формы противоопухолевых алкалоидов VCR и VLB. Разработаны новые УФ-спектрофотометрические методики идентификации и количественного определения эритроцитарных форм VCR и VLB в субстанциях и лекарственных формах. Установлены биофармацевтические характеристики ТИА препаратов (способность связываться с компонентами плазмы и форменными элементами крови). Установлены оптимальные условия изолирования изучаемых алкалоидов из биологического материала. Изучены эффективность включения ТИА (VCR и VLB) в эритроцитарные носители и влияние различных факторов на данный показатель. Исследованы физико-химические параметры ТИА инкапсулированных эритроцитов после процесса инкапсулирования. Определены характеристики высвобождения инкапсулированных препаратов из эритроцитов, оптимальные условия и сроки хранения полученных клеточных носителей.

Теоретическая значимость работы. Полученные клеточные формы алкалоидов VCR и VLB представляют интерес для противоопухолевой терапии как перспективные лекарственные системы для внутривенного введения. Применение таких систем значительно снижает их расход для достижения необходимого терапевтического эффекта вследствие улучшенной фармакокинетики, а также потенциально снижает риск побочных эффектов за счет направленной доставки субстанций, обладающих цитостатическими свойствами. Экспериментально обоснована возможность использования эритроцитарных носителей в качестве системы доставки изучаемых лекарственных

веществ (VCR и VLB). Определены оптимальные условия для инкапсулирования ТИА препаратов в эритроцитах.

Практическая значимость. Полученные клеточные носители с загруженными ТИА препаратами потенциально обладают возможностью для клинических применений. Масштабное производство лекарственных форм на основе ТИА инкапсулированных эритроцитарных носителей возможно с применением разработанной методики с системой «EryDex» (от компании «EryDel SPA», Италия) для применения в клинике. Возможность получения лиофилизированных форм ТИА инкапсулированных ЭН для продления срока годности ЭН. Существуют определенные возможности для пролонгированного действия ТИА препаратов за счет более длительного времени поддержания высокой концентрации в плазме (до 6 ч, по сравнению со свободным в\в введением препаратов (1-1,5 ч).

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- Результаты качественного и количественного определения VCR и VLB в субстанциях и лекарственных формах с применением разработанной спектрофотометрической методики;
- Результаты изучения возможности получения стабильных эритроцитарных форм, инкапсулированных VCR и VLB, с применением модифицированного метода гипотонического лизиса с предварительным набуханием;
- Результаты количественного определения VCR и VLB в полученных клеточных формах препаратов после предварительной очистки биоматериалов с помощью гель-хроматографии с применением разработанной методики;
- Результаты исследования возможности увеличения эффективности «загрузки» противоопухолевых препаратов VCR и VBL в клеточные носители при использовании сред для инкубации, модифицированных различными агентами (ПЭГ, ДМСО и АТФ);
- Результаты оценки морфологии и физико-химических свойств, полученных в работе эритроцитарных носителей после загрузки их ТИА;
- Результаты изучения устойчивости клеточных форм VCR и VLB при хранении, степени десорбции и кинетики высвобождения ТИА в аутологичной плазме и изотоническом буфере;
- Обоснование оптимальных условий и сроков хранения полученных клеточных эритроцитарных форм VCR и VLB.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды российских (Шварцбург Б.И, Кленнин В.И, Ивонин А.Г., Петровна Г.Т., Кулапина О.И., Шейко Л. М и др.) и зарубежных (Mauro Magnanni, Ihler G. M., Pierigè F., Sun Y., Eva P., Hisiger S., Owellen R. J., Sethi V. S., Villa C. H. *et al.*) исследователей, развивающих различные подходы к получению и стандартизации новых систем адресной доставки ЛС с большим количеством системных побочных эффектов. Методология исследования заключалась в разработке эффективного,

экономичного и экспрессного метода для исследования ТИА препаратов в биоматериале, определении экономически выгодного способа увеличения эффективности инкапсуляции исследуемых ЛС в клеточные носители, демонстрации возможности использования эритроцитарных форм в качестве системы доставки ТИА (VCR и VLB), а также рекомендаций по условиям хранения и срокам годности полученных новых клеточных форм известных противоопухолевых препаратов. При выполнении работы были использованы методы сравнительного, документированного анализа; комплекс физико-химических методов, технологических испытаний; математические методы анализа и обработки результатов.

Достоверность научных положений и выводов. Все полученные результаты и выводы, сделанные из них, основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований. В работе использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке. Разработанные методики оценивали. В исследовании использован достаточный объем литературных источников отечественных и иностранных авторов.

Апробация работы. Основные результаты исследования доложены на конференциях: 6-ая международная научно-методическая конференция «Фармообразование - 2016» (Воронеж, 2016), 7-ая международная научно-методическая конференция «Фармообразование - 2018» (Воронеж, 2018), VIII Всероссийская с международным участием конференция «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах — ФАГРАН-2018» (Воронеж, 2018). Апробация состоялась на совместном заседании кафедр фармацевтической химии и фармацевтической технологии, фармакологии и клинической фармакологии; управления и экономики фармации и фармакогнозии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (12.09.2018 г.).

Личный вклад автора. Лично автором осуществлен выбор научного направления, выполнена основная часть экспериментальных исследований. Во всех работах, опубликованных с соавторами, автору принадлежат постановка цели и задач, обоснование выбора оптимальных путей их решения, планирование и реализация эксперимента, анализ полученных результатов, формулировка общих выводов; участие в докладах и публикациях, внедрение результатов исследования.

Внедрение результатов исследования. Полученные экспериментальные результаты внедрены в учебный процесс при чтении лекций на курсах повышения квалификации фармацевтических работников по актуальным темам стандартизации и оценки качества противоопухолевых алкалоидов группы индола, а также современному состоянию проблемы применения систем адресной доставки лекарственных средств в медицине и фармации ФГБОУ ВО «ВГУ» (акт внедрения №1500-216 от 21.06.2018 г.); при проведении лабораторных занятий по качественному и количественному определению бисиндольных противоопухолевых алкалоидов VCR и VLB методом спектрофотометрии в УФ-области в субстанциях и лекарственных формах со студентами кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «ВГУ» по дисциплине

«Фармацевтическая химия» (акт внедрения № 1501-124 от 18.05.2018 г); при проведении лабораторных занятий по выделению бисиндольных противоопухолевых алкалоидов VCR и VLB методом гель-фильтрации из биологического материала (крови, плазмы крови, форменных элементов крови) (акт внедрения № 1002-07 от 02.07.2018 г).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2 и 3 паспорта специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «ВГУ» Минобрнауки РФ по научной проблеме «Исследование закономерностей аналоговых превращений аминокликанов в процессе создания новых противотуберкулезных, противоопухолевых и ранозаживляющих средств» (номер государственной регистрации 01201263909). Тема включена в план научных исследований фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «ВГУ» (протоколы заседаний Ученого совета факультета за период с 2012 по 2018 гг).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 8 статей, из которых 7 в журналах, входящих в список ВАК, 4 статьи в журналах, входящих в список Scopus, 3 из которых в англоязычных журналах.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 239 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков, 60 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, общих выводов, библиографического указателя, включающего 270 источников, в т.ч. 252 на иностранном языке, и приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования. Объектами исследований являлись винкристина сульфат и винбластин сульфат: «Винбластин-LANS®» («ЛЭНС-ФАРМ», Россия) и «Винкристин-Тева» («Teva Pharmaceutical Industries Ltd.» - Израиль), «VERO-винкристин» («ЛЭНС-фарм», Россия), «Винкристин-Рихтер» («Gedeon Richter Ltd.», Венгрия), которые были приобретены на внутреннем рынке в городе Воронеже и отвечают всем требованиям действующей нормативной документации в России.

Для выделения плазмы использовали донорскую кровь человека или кровь животных (беспородных крыс). В экспериментах с животными кровь получали из хвостовой вены под эфирным или хлороформным наркозом. От одной крысы брали 2,0 мл крови в гепаринированную пробирку

(1,0 мл крови – 150 мкл гепарина 5000 ЕД). Донорскую кровь получали из аналитической лаборатории клинической больницы. Сразу после получения пробы хранили в холодильнике при +4 °С до момента использования. Эритроциты выделяли из периферической крови человека или крыс по методу Воуит (1968), основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фико-колл-урографина. Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VLB использовали модифицированный метод гипоосмотического лизиса. Для выделения изучаемых ТИА препаратов из биологических материалов был применен метод гель-фильтрации на полимерных гелях декстрана (Сефадекс) G -10, G-25, G-100 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция). Для изучения взаимодействия ТИА препаратов VCR и VLB с компонентами плазмы и форменными элементами крови использовали разработанную методику, основанную на регистрации спектров поглощения в УФ-области VCR и VLB и измерении оптической плотности в максимуме поглощения при $\lambda_{(\text{макс})}$ 295 нм для VCR и $\lambda_{(\text{макс})}$ 268 нм для VLB в воде очищенной. Спектры поглощения исследуемых объектов в УФ – и видимой областях получали с помощью прибора Hitachi U-1900 (Япония). Спектральный диапазон – от 190 до 750 нм. Исследование спектров в ИК-области осуществляли на ИК-спектрофотометре «Avatar 360 FT- IR E.S.P.» в области волновых чисел 4000-500 см⁻¹. Подготовку к снятию ИК-спектров проводили методом получения таблетки 100 мг калия бромида и 1,0 мг исследуемого препарата.

Приготовление стандартных растворов. Для приготовления стандартного раствора VCR сульфата (раствора А) применяли «Винкристин-Рихтер» 1,0 мг лиофилизат для внутривенного введения, который содержит в составе: 100% активное вещество VCR сульфата 1,0 мг (в пересчете на безводное вещество) и вспомогательное вещество - лактоза. Содержимое 5 флаконов (точная навеска) аккуратно перемещали в мерную колбу объемом 50 мл и разводили водой очищенной до метки, получали раствор А с концентрацией 100 мкг/мл. Для приготовления стандартного раствора VLB сульфата (раствора А) применили «Винбластин-ЛЭНС» 5 мг лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. В составе 1 флакона содержится: 5,0 мг активного вещества VLB сульфат (в пересчете на безводное вещество). 5,0 мг лиофилизата VLB (точная навеска) аккуратно перемещали в мерную колбу объемом 50 мл и разводили водой очищенной до метки, получали раствор А с концентрацией 100 мкг/мл. Стандартные растворы хранили в темной склянке в холодильнике при +4 °С до времени употребления (не более 10 суток). В работе использовали реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия), отвечающие требованиям соответствующей НД.

Определение эффективности включения ТИА (VCR, VLB) в эритроциты проводили на основе расчета теоретического процента максимального инкапсулирования по известной формуле.

Для оценки поверхностной архитектоники клеток использовали метод оптической микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Загруженные эритроциты наблюдались под

масляной иммерсионной линзой с помощью оптического микроскопа. С помощью программы «Tourvive» вычисляли диаметр эритроцитов ($n=100$), загруженных ТИА препаратами и контрольных эритроцитов в изотоническом буфере. Размер ТИА инкапсулированных и свободных эритроцитов, экспериментально устанавливался с помощью спектра мутности.

Определение размера и физико-химических свойств эритроцитов (радиус эритроцитов, концентрация эритроцитов в 1 см^3 , проницаемость мембран эритроцитов, показатель среднего объема инкапсулированных эритроцитов, расчет площади поверхности эритроцита, толщина и объем эритроцитов) рассчитывали с помощью известных формул.

Определение осмотической резистентности ТИА загруженных эритроцитов вычисляли по проценту гемолиза по известной методике и рассчитывали по формуле.

Характеристики разработанных методик количественного определения VCR и VLB в субстанциях и лекарственных формах оценивали согласно ОФС ГФ XIII изд. «Валидация фармакопейных методик». Статистическую обработку экспериментальных данных проводили фармакопейным методом по ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента») и с помощью программы «Statistica - 7.0».

1. Разработка методик спектрофотометрического определения ТИА

В эксперименте для изучения спектральных характеристик ТИА в ультрафиолетовой области были сняты спектры поглощения стандартных растворов VCR и VLB сульфатов (25 мкг/мл) в различных растворителях (таблица 1).

Таблица 1. Спектральные характеристики VCR и VLB сульфатов в различных растворителях

Растворитель	VCR сульфат $\lambda_{(\max)}$ нм			VLB сульфат $\lambda_{(\max)}$ нм	
Метанол (J.Ph.XVII; E.Ph)	222 ± 2	256 ± 2	298 ± 2	214 ± 2	266 ± 2
Вода очищенная	219 ± 1	254 ± 1	295 ± 1	214 ± 1	268 ± 1
0,1 М NaOH	$218,5 \pm 1$	254 ± 1	$297,5 \pm 1$	214 ± 1	$268,5 \pm 1$
0,1 М HCl	219 ± 1	254 ± 1	$295,5 \pm 1$	214 ± 1	268 ± 1
Фосфатный буфер (pH=5)	223 ± 1	255 ± 1	$295,5 \pm 1$	222 ± 1	269 ± 1
Этанол 95%	226 ± 1	256 ± 1	297 ± 1	214 ± 1	265 ± 1
Хлороформ	241 ± 1	291 ± 1	299 ± 1	$249,5 \pm 1$	$290,5 \pm 1$

Установлено, что максимумы поглощения для водных растворов VCR и VLB сульфатов находились при 219 ± 1 , 254 ± 1 , 295 ± 1 нм и при 214 ± 1 , 268 ± 1 нм соответственно. В качестве оптимального растворителя для разработки методики количественного определения (аналитические максимумы - 295 нм для VCR и 268 нм для VLB) была выбрана вода очищенная, как наиболее дешевый, безопасный и доступный растворитель.

Для исследования аналитической области методик готовили ряд рабочих растворов (раствор Б) из стандартного раствора (раствора А) в диапазоне концентраций 1-250 мкг/мл (рис. 1).

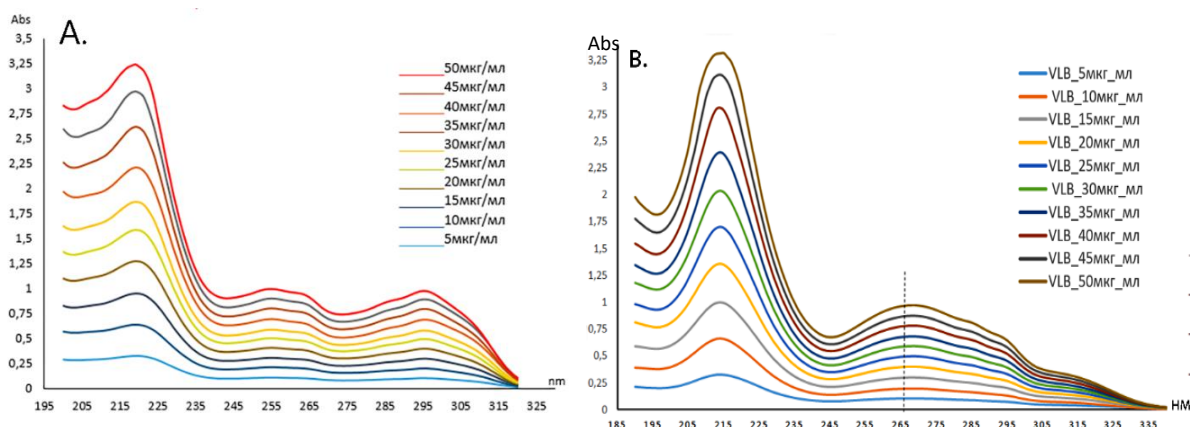


Рисунок 1. УФ-спектры растворов калибровочного графика

В полученных результатах показано, что оптимальной аналитической областью для количественного определения является интервал концентраций от 5 до 50 мкг/мл, т.к. показатель оптической плотности находится в диапазоне 0,1-1,0. На основе полученных данных (рис. 1) построены калибровочные графики. Параметры линейных зависимостей представлены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры калибровочных графиков VCR и VLB

Параметр линейности	VCR	VLB
Коэффициент - a	0,01954	0,01923
Коэффициент - b	0,01120	0,01153
Уравнения регрессии	$y = 0,0195x + 0,0112$	$y = 0,0192x + 0,0115$
Коэффициент корреляции	0,99985	0,99991
SD	0,00538	0,00438
Теоретический предел обнаружения, мкг/мл	2,108	2,022
Предел количественного определения, мкг/мл	6,389	6,126
$E^{1\%}_{1cm}$	201,0191	198,0615

Оценку методик проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII (ОФС.1.1.0012.15). Для определения прецизионности методики использовали три серии растворов на трех уровнях концентраций изучаемых веществ 10, 25 и 40 мкг/мл. Точность методик определяли путем добавления стандартного количества VCR и VLB в растворы для образцов 50 мкг, 125 мкг и 250 мкг. Предел обнаружения для VCR и VLB вычисляли по уравнениям калибровочных графиков. Робастность методик устанавливали по влиянию pH среды (буферные растворы с pH = 3 – 10) на результаты измерений. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты оценки разработанных методик спектрофотометрического определения ТИА

Параметр аналитической методики	VCR	VLB
Прецизионность	$R_{cp}(\%)=100,08$; $SD = 1,9658$; $RSD=0,01964$	$R_{cp}(\%)=100,17$; $SD = 0,9258$; $RSD = 0,00924$
Правильность	$R_{cp}=100,32\%$; $SD = 0,2539$; $RSD = 0,0025$	$R_{cp}= 100,14\%$; $SD = 1,1733$; $RSD = 0,012$

Экспериментально установленный предел обнаружения, (мкг/мл)	1,4226	1,2205
Воспроизводимость	$\bar{X} = 100,09\%$; $SD = 0,29173$; $RSD = 0,00292$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 100,09 \pm 0,36 \%$; $P = 95\%$; $\xi = 0,81026\%$	$\bar{X} = 100,03\%$; $SD = 0,34024$; $RSD = 0,0034$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 100,03 \pm 0,42\%$; $P = 95\%$; $\xi = 0,9456\%$
Робастность	Положение максимума поглощения остается стабильным в интервале от 3,0 до 7,0 единиц pH	

Таким образом, осуществлена разработка и оценка спектрофотометрических методик количественного определения ТИА (на примере VCR и VLB сульфатов). Разработанные методики далее использованы в работе для определения VCR и VLB сульфатов в лекарственных формах, а также полученных клеточных формах препаратов и биологическом материале.

2. Разработка методик количественного определения ТИА в биологическом материале

Определение оптимальных условий удаления белка. В результате выполненных исследований было установлено, что наиболее полное осаждение белка плазмы крови и гемолизата клеток наблюдается при использовании 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Исследования показали, что, как для плазмы крови, так и для гемолизата клеток, оптимальное соотношение осадителя и биоматериала составляет 1:1, а наилучшее время центрифугирования составляет 5 мин при 8000 об/мин (таблица 4).

Таблица 4. Результаты выбора оптимальных условий удаления белка

Параметр методики	Оптическая плотность (λ_{\max} -280 нм)	
	Плазма крови	Гемолизат клеток
Способ осаждения		
Кипячение в течение 10 минут	0,354	0,384
10% раствор хлорной кислоты	0,330	0,363
20% раствор хлорной кислоты	0,216	0,245
30% раствор хлорной кислоты	0,129	0,160
10% раствор цинка сульфата + 0,1 М раствор гидроксида натрия	0,258	0,296
10% раствор трихлоруксусной кислоты	0,244	0,302
20% раствор трихлоруксусной кислоты	0,163	0,201
30% раствор трихлоруксусной кислоты	0,059	0,103
Соотношение осадителя и биоматериала		
0,5:1	0,893	0,914
0,75:1	0,334	0,353
1:1	0,071	0,101
1,5:1	0,068	0,087
Время центрифугирования, мин		
3	0,336	0,353
5	0,069	0,103
10	0,069	0,109
15	0,068	0,102

Было установлено, что действием 30% раствора трихлоруксусной кислоты не удаётся полностью избавиться от эндогенных компонентов биоматериалов, мешающих определению изучаемых

представителей ТИА. В связи с этим была исследована возможность выделения ТИА методом гель-хроматографии.

Выбор оптимальных условий гель-хроматографического выделения ТИА. В эксперименте использовали различные марки Сефадекса (G-25, G-50, G-100). В качестве элюентов использованы вода очищенная, растворы натрия хлорида, натрия гидроксида и кислоты хлористоводородной различных концентраций (рис. 2). При этом установлены объёмы выхода ТИА, которые явились одним из параметров в дальнейшем определении оптимальных условий выделения препаратов из биологического материала. Полученные результаты хроматографического поведения изучаемых препаратов показаны в таблице 5.

Таблица 5. Характеристики хроматографического элюирования ТИА препаратов*

№ колонки	Элюент	V ₀ , мл	Скорость элюента, мл/ч	Найдено (m)	
				мкг	%
VCR					
I	Вода очищенная	54	10	994,288	99,43
II	0,1 М HCl	58	12	990,682	99,07
III	0,1 М NaOH	46	8	989,256	98,93
IV	0,01 М Na-Фосфатный буфер	50	10	991,639	99,16
VLB					
I	Вода очищенная	52	10	997,684	99,77
II	0,1 М HCl	50	10	992,422	99,24
III	0,1 М NaOH	48	8	995,206	99,52
IV	0,01 М Na-Фосфатный буфер	56	12	990,449	99,05

*Тип геля - Сефадекс G-25; длина слоя геля (см) – 10; добавленные количества VCR и VLB – 1000 мкг. Результаты эксперимента аналогичны для всех изучаемых ТИА.

ТИА препараты VCR и VLB хорошо растворяются в воде очищенной, а полученные результаты показывают высокую степень их вымывания из колонки. Вода очищенная является дешевым и эффективным элюентом для изолирования ТИА препаратов при помощи Сефадекс G-25 (рис. 2).

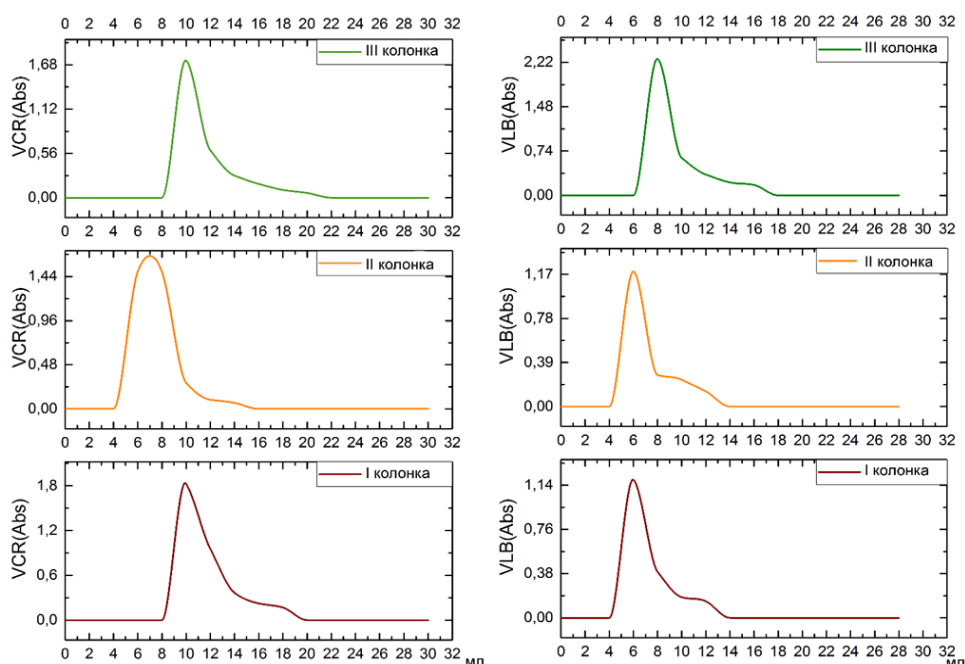


Рисунок 2. Элюентные хроматограммы ТИА после оптимизации хроматографической колонки

3. Получение клеточных носителей для направленного транспорта в организме ТИА препаратов VCR и VLB

Изучение взаимодействия ТИА препаратов VCR и VLB с компонентами плазмы и форменными элементами крови in vitro. Для изучения взаимодействия VCR и VLB с плазмой и форменными элементами крови, приготовлены 3 типа модельных образцов: Модельный образ А - (Кровь + препараты); Модельный образ Б - (Плазма + препараты); Модельный образ В - (Эритроциты + препараты). Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Количественное содержание свободного препарата в гемоллизате

№ - коллонки	L (см)	Взято для приготовления модельного образца (мкг)	Найдено			Метрологические характеристики результатов определения
			m (мкг)	m _{ср.} (мкг)	m _{ср.} %	
VCR						
I	10	1000	341,422	358,580	35,86	$y = 0,0195x + 0,0112$ $\bar{X} = 35,57 \%$ $SD = 1,5372; RSD = 0,04322$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 35,57 \pm 2,44 \%$ P = 95% $\xi = 6,8721 \%$
II	10	1000	375,738			
III	5,1	1000	346,181	352,736	35,27	
IV	5,1	1000	359,291			
VLB						
I	5,1	500	216,564	215,493	43,10	$y = 0,0192x + 0,0115$ $\bar{X} = 43,23 \%$ $SD = 0,9023; RSD = 0,0209$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 43,23 \pm 1,43 \%$ P = 95% $\xi = 3,3189 \%$
II	5,1	500	214,421			
III	10	1000	444,285	433,600	43,36	
IV	10	1000	422,920			

Обнаруженное содержание свободного VCR в гемоллизате (таблица 6) в среднем составило $35,57\% \pm 2,444$ (относительная погрешность (ξ) = 6,8721 %; P = 95%) и VLB - $43,23\% \pm 1,4347\%$ (относительная погрешность (ξ) = 3,3189%; P = 95%) от вводимой дозы.

Изучение взаимодействия ТИА VCR и VLB с компонентами плазмы крови. Результаты эксперимента приведены в таблице 7.

Таблица 7. Количественное содержание найденного препарата в процентном соотношении к связанному во фракции препарату

L (см)	Связанные фракции препаратов						
	В гемоллизате	В плазме			С форменными элементами крови		
	m _{ср.} (мкг)	m _{ср.} (мкг)	% (от общ. связанной фракции)	Ср. %*	m _{ср.} (мкг)	% (от общ. связанной фракции)	Ср. %*
VCR							
5,1	647,264	339,354	52,43	52,67	307,910	47,57	47,33
10	641,420	339,354	52,91		302,066	47,09	
VLB							
5,1	284,507	301,118	52,92	53,04	267,896	47,08	46,96
10	566,400	301,118	53,16		265,282	46,84	

В таблице 7 показаны результаты связывания с компонентами плазмы VCR - $52,67\% \pm 0,54$ и VLB - $53,04\% \pm 0,27$ по отношению к общей связанной фракции соответственно, а также с форменными элементами VCR - $47,33\% \pm 0,54$ и VLB - $46,96\% \pm 0,27\%$ (относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 1,025 при $P = 95\%$).

Изучение взаимодействия ТИА VCR и VLB с форменными элементами крови. Результаты эксперименты представлены в таблице 8.

Таблица 8. Количественное содержание найденных и связанных препаратов с форменными элементами крови

№ колонки	Найдено			Связанно		
	m (мкг)	R %*	Метрологические характеристики	m (мкг)	R %	Метрологические характеристики
VCR						
I	531,509	53,15	$\bar{X} = 53,09$ $SD = 0,06752$ $RSD = 0,0013$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 53,09 \pm 0,1073\% (P = 95\%)$ $\xi = 0,2022\%$	468,491	46,85	$\bar{X} = 46,91$ $SD = 0,06752$ $RSD = 0,0014$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 46,91 \pm 0,11\% (P = 95\%)$ $\xi = 0,2288\%$
II	531,271	53,13		468,729	46,87	
III	530,657	53,07		469,343	46,93	
IV	529,992	53,00		470,001	47,00	
VLB						
I	538,426	53,84	$\bar{X} = 53,69$ $SD = 0,1914$ $RSD = 0,0036$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 53,69 \pm 0,3043\% (P = 95\%)$ $\xi = 0,5667\%$	461,574	46,16	$\bar{X} = 46,23$ $SD = 0,06752$ $RSD = 0,0014$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 46,91 \pm 0,10\% (P = 95\%)$ $\xi = 0,2200\%$
II	538,105	53,81		461,895	46,19	
III	537,418	53,42		462,582	46,26	
IV	537,005	53,70		462,995	46,30	

* взято для приготовления модельного образца – 1000 мкг.

В проведенном анализе с модельными образцами «В» подтверждаются данные, которые были получены в проведенном эксперименте с моделями «А» и «Б». Результаты в таблице 8 показывают, что препараты VCR - $46,91\% \pm 0,1073\%$ и VLB - $46,23\% \pm 0,1017\%$ ($P = 95\%$) взаимодействуют с форменными элементами крови (эритроцитами) и остаются необнаруженными (относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 0,2288%). Таким образом, установлено, что ТИА препараты обладают высокой способностью связываться с компонентами плазмы и форменными элементами крови.

Получение эритроцитарных клеточных форм ТИА препаратов VCR и VLB. Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VLB использован модифицированный метод гипосмотического лизиса. Полученные данные, представленные в таблице 9, свидетельствуют о довольно близкой степени включения исследуемых веществ в ЭН.

Таблица 9. Сравнительные данные об эффективности включения ТИА препаратов

Характеристика ЭН	Препарат	Эффективность включения препаратов, E (%)* ($\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$)	Практическое содержание в надосадочной жидкости, E(%)*	Общее количество найденных препаратов (Сред. зна.) (%)	Потеря препаратов, %
После изолирования 1-4 нед.	VCR	$32,45 \pm 3,457$	$66,75 \pm 3,332$	99,20	0,80

С.И.	VCR	42,96 ± 3,946	55,94 ± 4,211	98,90	1,10
После изолирования 1-4 нед.	VLB	31,22 ± 5,569	67,42 ± 5,377	98,64	1,36
С.И.	VLB	44,27 ± 3,866	54,58 ± 4,257	98,84	1,16

*- результаты представлены в виде среднего значения $\pm \Delta \bar{x}$ (P = 95%)

Эффективность включения VCR и VLB в свежеизолированные эритроциты составила в среднем $42,96 \pm 3,946\%$ и $44,27 \pm 3,866\%$ соответственно (относительная погрешность среднего результата не превышала (ξ) - 9,184%). Эти показатели демонстрируют, что эффективность загрузки значительно повышается при использовании свежеизолированных эритроцитов. В технологическом процессе получения ТИА инкапсулированных препаратов в ЭН потери препарата значительны. С фармацевтической и технологической точки зрения это не выгодно, поэтому разработка методики, позволяющей увеличить эффективность инкапсуляции ТИА препаратов, является актуальным направлением исследований.

Изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» эритроцитов ТИА препаратами. Инкапсулирование препаратов проводилось в модифицированной среде с ПЭГ (ПЭГ-400 и ПЭГ-4000 (1:5, 1:10, 1:20; 1:50; 1:100); с ДМСО (2 мг/мл) и АТФ (2 мг/мл). Полученные результаты представлены в таблицах 10-12.

Таблица 10. Эффективность «загрузки» ТИА препаратов в ЭН в модифицированной среде с ПЭГ

№ колонки *	Марка ПЭГ	Взято для инкубирования (мкг)	Соотношение ТИА: ПЭГ	Инкапсулированное количество (мкг)	Эффективность загрузки, E (%)	Метрологические характеристики
VCR						
I	ПЭГ 4000	2200	1:5	1190,686	54,12	$\bar{X} = 53,30\%$; $SD = 12,318\%$; $RSD = 0,2311$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 53,30 \pm 15,31\%$; $P = 95\%$; $\xi = 64,243\%$
II	ПЭГ 4000	2200	1:10	1428,849	64,95	
III	ПЭГ 4000	2200	1:20	1445,387	65,70	
IV	ПЭГ 4000	2200	1:50	942,865	42,86	
V	ПЭГ 4000	2200	1:100	855,488	38,89	
VLB						
I	ПЭГ 4000	2000	1:10	907,674	45,38	$\bar{X} = 46,11\%$; $SD = 7,003\%$; $RSD = 0,1519$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 46,11 \pm 8,71\%$ $P = 95\%$; $\xi = 42,228\%$
II	ПЭГ 4000	2000	1:20	1000,639	50,03	
III	ПЭГ 4000	2000	1:50	808,223	40,41	
IV	ПЭГ 4000	2000	1:100	776,890	38,84	
V	ПЭГ 400	2000	1:20	1117,146	55,86	

* Здесь и в таблицах 11-12, L хроматографической колонки (Сефадкс G -25) = 10 см, d = 10 мм. Температура элюирования – комнатная.

В результате видно, что в среде, модифицированной ПЭГ, эффективность «загрузки» VCR в ЭН составила в среднем $53,30 \pm 15,31\%$ и VLB - $46,11 \pm 8,71\%$ (относительная погрешность среднего результата не превышала (ξ) 28,73%). Также установлено, что эффективность загрузки ТИА в средах, модифицированных ПЭГ-4000 и ПЭГ-400 (ТИА: ПЭГ - 1:20), возрастает на 10-20% в разных случаях и составляет для VCR - 65,70% и для VLB - 55,86%.

Таблица 11. Эффективность загрузки ТИА препаратов в ЭН в модифицированной среде с ДМСО (2 мг/мл) *

№ колонки	Инкапсулированное количество (мкг)	Эффективность загрузки, E (%)	Метрологические характеристики
VCR			
I	1377,341	62,61	$\bar{X} = 61,07\%$; $SD = 2,5821\%$; $RSD = 0,4234$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 61,07 \pm 3,21\%$; $P = 95\%$; $\xi = 11,7540\%$
II	1254,739	57,03	
III	1325,765	60,26	
IV	1358,654	61,76	
V	1401,321	63,70	
VLB			
I	1408,105	64,01	$\bar{X} = 62,43\%$; $SD = 2,5288\%$; $RSD = 0,1519$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 62,43 \pm 3,14\%$; $P = 95\%$; $\xi = 11,2618\%$
II	1287,311	58,51	
III	1398,345	63,56	
IV	1423,908	64,72	
V	1349,087	61,32	

*Здесь и в таблице 12: взято для инкубирования 2200 мкг ТИА.

При модифицировании среды ДМСО наблюдается увеличение эффективности загрузки в ЭН на 15 – 20% по сравнению с немодифицированной средой и составляет для VCR и VLB $61,07 \pm 3,21\%$ и $62,43 \pm 3,15\%$ ($P = 95\%$) соответственно (относительная погрешность среднего результата не превышала (ξ) 5,26%).

Таблица 12. Эффективность загрузки ТИА препаратов в ЭН в модифицированной среде с АТФ (2 мг/мл)

№ колонки	Инкапсулированное количество (мкг)	Эффективность загрузки, E (%)	Метрологические характеристики
VCR			
I	1001,8743	45,54	$\bar{X} = 49,61\%$; $SD = 3,4161\%$; $RSD = 0,06889$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 49,61 \pm 4,2471\%$; $P = 95\%$; $\xi = 19,1435\%$
II	1053,6402	47,89	
III	1114,9395	50,68	
IV	1083,1154	49,23	
V	1203,3340	54,70	
VLB			
I	936,6816	42,58	$\bar{X} = 49,23\%$; $SD = 4,7126\%$; $RSD = 0,957$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{x} = 49,23 \pm 5,8590\%$; $P = 95\%$; $\xi = 26,6129\%$
II	1224,9609	55,68	
III	1072,9837	48,77	
IV	1115,0303	50,68	
V	1065,4529	48,43	

Полученные результаты (таблица 12) демонстрируют увеличение эффективности загрузки ТИА препаратов в среде, модифицированной с АТФ, на 5-7%. Эффективность включения ТИА препаратов в модифицированной среде с 2 мг/мл АТФ при этом в среднем составила для VCR и VLB - $49,61 \pm 4,249\%$ и $49,23 \pm 5,858\%$ соответственно (относительная погрешность среднего результата не превышала (ξ) 11,898%).

Сравнительные данные об эффективности включения ТИА препаратов в ЭН в модифицированных средах приведены на рис. 3.

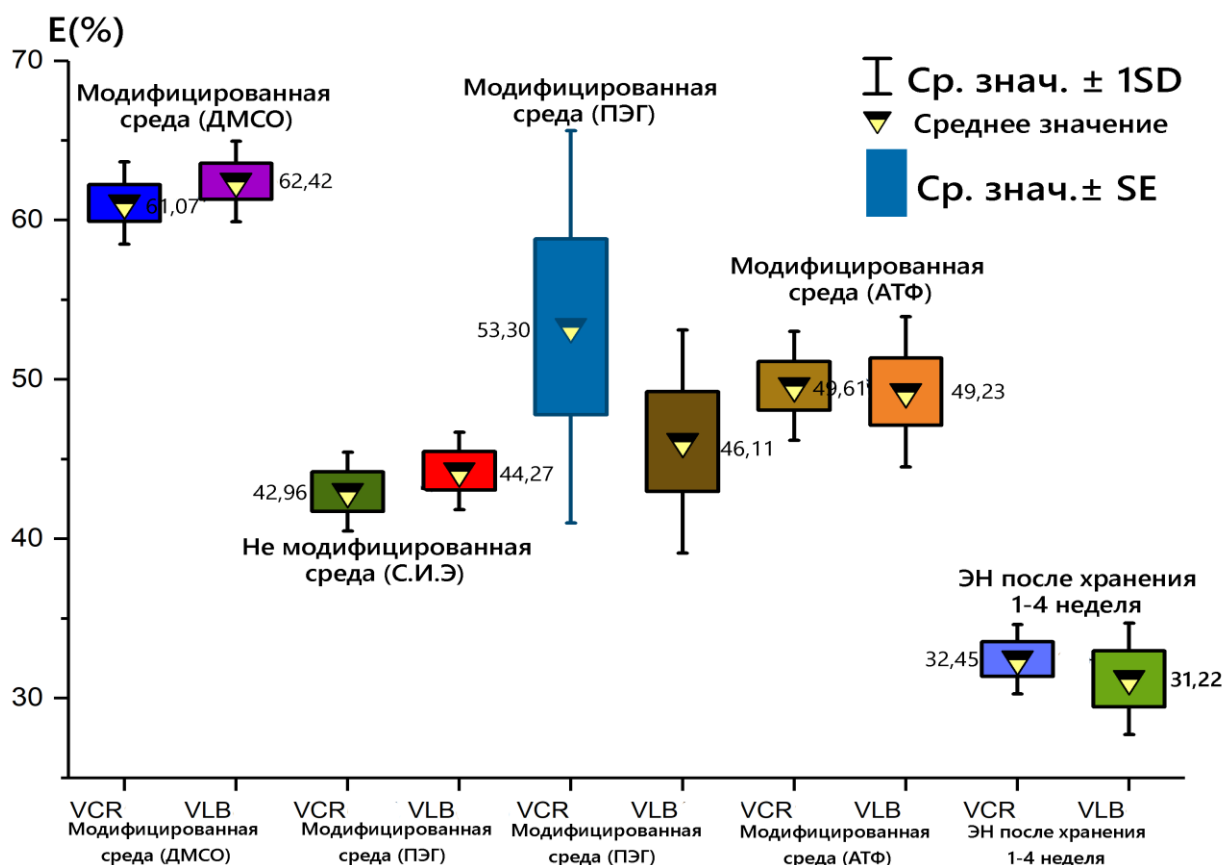


Рисунок 3. Сравнительный график эффективности включения ТИА препаратов в ЭН в немодифицированной среде и модифицированных средах
SD - стандартное отклонение, E% - эффективность загрузки ТИА; SE - стандартная ошибка среднего результата

4. Изучение свойств ЭН с инкапсулированными ТИА

У полученной эритроцитарной лекарственной формы исследовали морфологические и функциональные свойства *in vitro*. Контролем служили отмытые эритроциты, инкубируемые в фосфатном буфере. На рис. 4 видно, что эллипсоидальная форма после загрузки не изменялась.

Определение размера и физико-химических свойств эритроцитов. Оптико-микроскопические исследования показали, что инкубация эритроцитов с ТИА сопровождалась незначительными изменениями эритроцитов. При помощи метода спектральной мутности, установлено, что диаметр загруженных эритроцитов уменьшается на 1,0 - 1,5 мкм по сравнению с незагруженными эритроцитами: ($d - 7,2689 \pm 0,092$ мкм и $8,5525 \pm 0,125$ мкм ($P=95\%$) соответственно (относительная погрешность среднего результата(ξ) не превышала 1,46%) (рис. 4). Содержание воды в эритроцитах при инкапсулировании уменьшается приблизительно на 3% по сравнению с изолированными контрольными эритроцитами. Показано, что в процессе инкапсулирования процентное содержание сухого вещества увеличивается приблизительно на 3% по отношению к контрольным эритроцитам, а размер эритроцитов уменьшается.

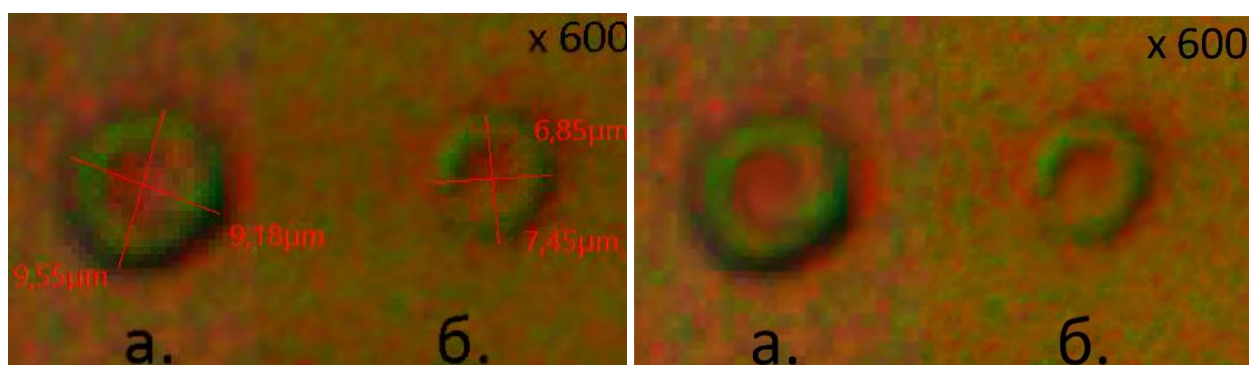


Рисунок 4. Оптическое изображение контрольных эритроцитов и загруженных ТИА эритроцитов (6X цифровое увеличение): слева – контрольные эритроциты, справа - ТИА препараты, загруженные в эритроциты

Полученные значения показателя проницаемости мембран эритроцитов (ППМЭ) в контрольных эритроцитах составляли $1,3259 \pm 0,00233$ ($P=95\%$; $\xi= 0,17554\%$), а в ТИА инкапсулированных $1,4579 \pm 0,02487\%$ ($P=95\%$; $\xi= 1,7055\%$), что свидетельствует об увеличении проницаемости эритроцитарной мембраны в процессе инкапсулирования. ЭН, инкапсулированные в модифицированной среде с ПЭГ 1:20, имеют значительно меньшие значения ППМЭ (1,44864), чем инкапсулированные в немодифицированной среде.

Таким образом, получена ТИА инкапсулированная эритроцитарная форма с минимальными повреждениями эритроцитов.

Изучение устойчивости КН к десорбции и высвобождению ТИА препаратов. В проведенном эксперименте в течение 6 ч *in vitro* определены характеристики высвобождения инкапсулированных препаратов из эритроцитов. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13. Общее количество высвобождающихся ТИА из различных эритроцитарных форм *in vitro* (% выражение*)

Эритроцитарные формы ТИА	Время инкубации (t) мин						
	10	20	40	60	120	240	360
VCR	4,84	10,22	23,67	40,29	45,07	48,18	54,53
VCR:ПЭГ 4000 - 1:5	5,43	8,80	16,65	30,30	37,34	45,39	53,33
VCR:ПЭГ 4000 - 1:10	3,78	6,34	9,24	19,07	24,76	31,36	40,13
VCR:ПЭГ 4000- 1:20	4,04	7,08	10,74	17,36	25,48	34,66	39,99
VCR:DMCO	7,30	12,97	18,93	25,23	37,68	47,97	54,23
VLB	8,30	15,45	31,34	49,45	60,52	64,80	68,07
VLB:ПЭГ 4000 - 1:10	6,70	13,04	23,47	37,51	44,97	51,85	63,89
VLB:ПЭГ 4000 - 1:20	8,36	17,16	25,32	44,81	52,87	58,06	60,75
VLB:ПЭГ 400- 1:20	11,59	19,80	28,66	36,63	43,98	50,78	60,35
VLB:DMCO	9,59	16,73	24,42	32,77	46,19	56,25	64,50

*среднее знач.; $SD_{(VCR)} \leq 3,72$; $SD_{(VLB)} \leq 6,1$.

Согласно результатам, представленным в таблице 13 и на рис. 5 видно, что высвобождение инкапсулированных ТИА препаратов из эритроцитарных носителей составляло в среднем для VCR - $54,93 \pm 3,29\%$, VCR: ПЭГ4000 1:5 - $53,33 \pm 2,60\%$, VCR: ПЭГ 4000 1:10 - $40,13 \pm 4,74\%$, VCR: ПЭГ4000 1:20 - $39,99 \pm 2,86\%$, VCR: DMCO 2 мг/мл - $54,24 \pm 8,87\%$, VLB - $68,07\% \pm 14,55$; VLB: ПЭГ 4000 1:10- $63,89\% \pm 6,75$; VLB: ПЭГ 4000 1:20- $60,75\% \pm 6,11$; VLB: ПЭГ 400 1:20-

60,35% ± 7,63; VLB: ДМСО 2 мг/мл - 64,50% ± 1,91 от инкапсулированных в эритроцитарных форм за отмеченный период времени в 6 ч. (относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 21,38%).

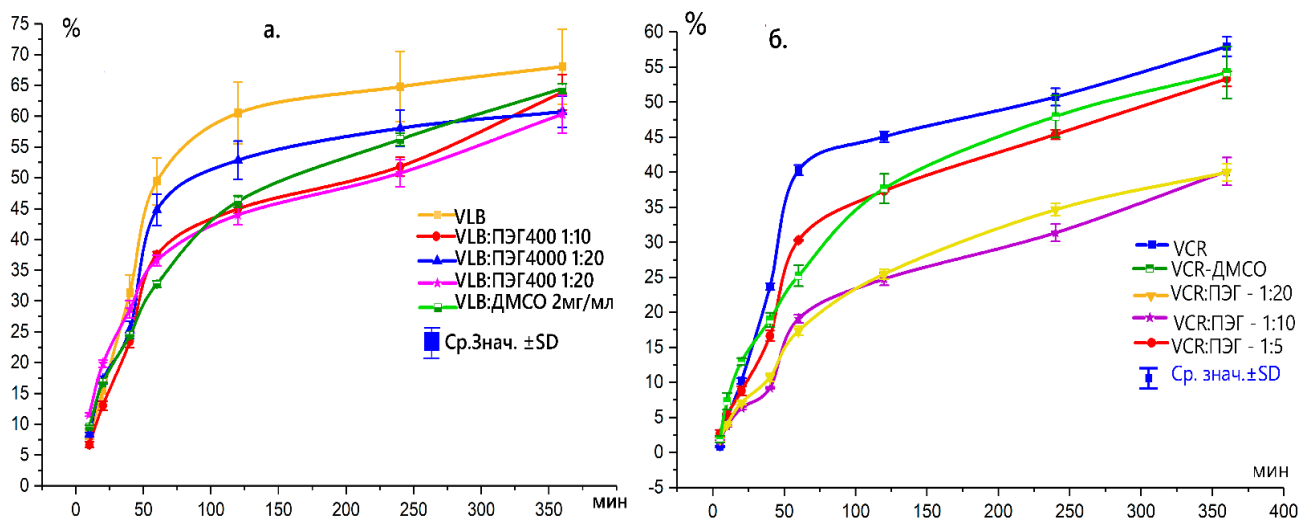


Рисунок 5. График зависимости высвобождения VLB и VCR сульфата из различных эритроцитарных форм *in vitro* (37 °C) от времени инкубации
 а.- Кумулятивное высвобождение VLB сульфата, б. Кумулятивное высвобождение VCR сульфата (% , ср. знач.± SD) от инкапсулированного количества препарата в ЭН

Определение стабильности КН и клеточных форм ТИА препаратов. Исследования осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) проводили для нормальных и ТИА инкапсулированных эритроцитов. Полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14. Данные о степени гемолиза различных ТИА-загруженных ЭН

NaCl, %	Степень гемолиза $K_{(Hb)}$, %			
	Контрольные эритроциты*	ТИА-Эритроциты*	ТИА-ПЭГ-Эритроциты*	ТИА-ДМСО-Эритроциты*
0,1	100	100	100	100
0,2	95,32 ± 0,684	99,17 ± 0,87	94,86 ± 0,79	96,28 ± 0,95
0,3	80,26 ± 0,45	89,59 ± 1,63	87,54 ± 1,48	89,18 ± 1,82
0,4	29,35 ± 0,98	66,61 ± 2,04	62,87 ± 1,2	66,05 ± 2,17
0,5	13,67 ± 0,67	33,46 ± 1,35	31,95 ± 1,4	32,51 ± 1,86
0,6	5,30 ± 0,22	24,35 ± 1,62	23,08 ± 0,76	23,58 ± 1,73
0,65	4,24 ± 0,41	15,17 ± 1,74	14,70 ± 1,05	14,89 ± 1,04
0,7	3,58 ± 0,88	7,06 ± 1,96	6,83 ± 1,08	6,96 ± 1,49
0,8	3,11 ± 0,43	5,55 ± 1,25	5,38 ± 0,91	5,48 ± 0,36
0,9	1,12 ± 0,13	4,03 ± 0,85	3,76 ± 0,39	3,86 ± 0,92

n=3; *Ср. знач. ± SD

Таблица 15. Метрологические характеристики среднего результата степени гемолиза (K_{Hb}) разных ТИА-загруженных эритроцитарных форм в 0,4% растворе NaCl

Метрологическая характеристика среднего результата	Степень гемолиза (K_{Hb}) разных ТИА-загруженных эритроцитарных форм в 0,4% растворе NaCl			
	Контрольные эритроциты (%)*	Ery-VCR (%)*	Ery-VCR: ПЭГ (%)*	Ery-VCR-ДМСО (%)*
\bar{x}	25,39	66,61	62,87	66,05
s^2	0,966	4,14	1,43	4,70

SD	0,983	2,03	1,20	2,17
RSD	0,033	0,03	0,019	0,033
$\Delta\bar{x}^*$	2,44	5,05	2,97	5,39
ξ	8,30	7,58	4,72	8,15

n = 3; *P = 95%,

Данные, приведенные в таблице 15 показывают, что ТИА инкапсулированные ЭН гемолизируются в среднем на $65,18\% \pm 5,0$ (P = 95%) в сравнении с контрольными эритроцитами, которые гемолизируются на $29,39\% \pm 2,44$ в 0,4% растворе NaCl (относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 8,3%). Инкапсулирование эритроцитов в среде, модифицированной ПЭГ, показывает повышение устойчивости к гемолизу по сравнению с эритроцитами, инкапсулированными в немодифицированной среде. Это свидетельствует о том, что ПЭГ могут стабилизировать и минимизировать повреждения клеточных мембран эритроцитов в процессе инкапсуляции.

Турбулентная хрупкость эритроцитов является еще одной характеристикой, которая зависит от изменений в целостности клеточной мембраны и отражает устойчивость нагруженных эритроцитов к гемолизу, вызванному турбулентным потоком внутри капиллярной при сосудистой циркуляции в организме (таблица 16). Из результатов, описанных в таблице 17 видно, что после энергичного встряхивания и 6 часов инкубации при 37°C , выделение гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитарных форм имеет среднее значение для VCR, инкапсулированного в немодифицированной среде – $7,39\% \pm 0,249$, а для VLB – $7,36\% \pm 0,241$. Для VCR, инкапсулированного в модифицированной среде VCR:ПЭГ4000 1:20 – $7,25\% \pm 0,24$, VLB:ПЭГ4000 1:20 $7,27\% \pm 0,117$, VCR:DMCO – $7,39\% \pm 0,412$, VLB:DMCO $7,26\% \pm 0,175$. Выделение гемоглобина из контрольной пробы составило $6,8\% \pm 0,175$ (P = 95%). Относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 5,6%. Полученные результаты показывают, что высвобождение гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитов по сравнению с неинкапсулированными, имеет тенденцию к увеличению в среднем на 6% после энергичного встряхивания и 6 часов инкубации при 37°C .

Таблица 16. Высвобождение гемоглобина из ТИА нагруженных эритроцитов после энергичного встряхивания *in vitro*

Время инкубации (мин)	Выделение гемоглобина Hb, %*						
	Контрольные эритроциты	Эритроциты-VCR	Эритроциты-VLB	Эритроциты-VCR: ПЭГ 4000 1:20	Эритроциты-VLB: ПЭГ 4000 1:20	Эритроциты-VCR-DMCO	Эритроциты-VLB-DMCO
10	$3,48 \pm 0,04$	$3,82 \pm 0,04$	$3,89 \pm 0,04$	$3,73 \pm 0,03$	$3,73 \pm 0,03$	$3,88 \pm 0,04$	$3,83 \pm 0,06$
20	$4,09 \pm 0,06$	$4,28 \pm 0,03$	$4,36 \pm 0,03$	$4,35 \pm 0,07$	$4,37 \pm 0,03$	$4,59 \pm 0,03$	$4,56 \pm 0,03$
40	$4,73 \pm 0,07$	$5,35 \pm 0,03$	$5,49 \pm 0,04$	$5,64 \pm 0,06$	$5,62 \pm 0,04$	$5,97 \pm 0,04$	$6,02 \pm 0,06$
60	$5,58 \pm 0,06$	$5,91 \pm 0,04$	$6,03 \pm 0,08$	$6,11 \pm 0,04$	$6,04 \pm 0,03$	$6,3 \pm 0,08$	$6,23 \pm 0,03$
120	$5,98 \pm 0,04$	$6,49 \pm 0,06$	$6,81 \pm 0,04$	$6,53 \pm 0,04$	$6,47 \pm 0,06$	$6,59 \pm 0,04$	$6,64 \pm 0,04$
240	$6,32 \pm 0,04$	$6,90 \pm 0,07$	$7,04 \pm 0,03$	$7,00 \pm 0,03$	$6,71 \pm 0,04$	$6,97 \pm 0,03$	$6,83 \pm 0,06$
360	$6,80 \pm 0,04$	$7,09 \pm 0,04$	$7,21 \pm 0,06$	$7,25 \pm 0,06$	$7,16 \pm 0,09$	$7,39 \pm 0,06$	$7,26 \pm 0,04$

n=3, *- Сред. зн $\pm \overline{SD}$

Таблица 17. Метрологическая характеристика среднего результата высвобождения гемоглобина из различных ТИА-загруженных эритроцитарных форм после энергичного встряхивания (после инкубации 6 ч.)

Метрологическая характеристика среднего результата	Высвобождение гемоглобина (%)						
	ЭН без инкапсулирования (%)*	Ery-VCR (%)*	Ery-VLB (%)*	Ery-VCR: ПЭГ 4000 1:20 (%)*	Ery-VLB: ПЭГ 4000 1:20 (%)*	Ery-VCR-ДМСО (%)*	Ery-VLB-ДМСО (%)*
\bar{x}	6,8	7,39	7,36	7,25	7,27	7,37	7,33
S^2	0,0054	0,0109	0,0102	0,101	0,024	0,03	0,005
SD	0,0735	0,1044	0,1012	0,1007	0,0491	0,173	0,0733
RSD	0,01081	0,0141	0,0142	0,0139	0,0068	0,0235	0,01001
$\Delta\bar{x}^*$	0,17528	0,2489	0,2414	0,2401	0,1171	0,4125	0,1748
ξ	2,58	3,37	3,28	3,31	1,61	5,59	2,39

*P=95%

Определение стабильности КН и клеточных форм VCR и VLB при хранении. Для изучения стабильности КН с включёнными ТИА, ЭН инкубировали в Na-фосфатном буфере при различных температурах. Стабильность определяли по степени высвобождения гемоглобина из эритроцитов при хранении. Полученные экспериментальные результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18. Степень гемолиза ТИА инкапсулированных ЭН при хранении в различных условиях

Форма ЭН	Степень гемолиза, $K_{(нб)}$								
	1 день			3 день			6 день		
	Температура, °C			Температура, °C			Температура, °C		
	4	10	20	4	10	20	4	10	20
ЭН	1,028	1,057	1,415	1,764	1,849	2,057	2,283	2,528	3,028
VCR-ЭН I	1,189	1,236	1,764	1,943	2,34	2,811	2,887	3,094	3,575
VCR - ЭН II	1,142	1,283	1,811	2,038	2,283	2,783	2,915	3,123	3,472
VCR- ЭН III	1,208	1,264	1,849	1,981	2,255	2,811	2,84	3,283	3,698
VCR- ЭН IV	1,226	1,311	1,783	2,085	2,302	2,764	2,925	3,104	3,528
VLB- ЭН I	1,142	1,226	1,868	2,047	2,217	2,717	2,906	3,17	3,472
VLB- ЭН II	1,208	1,264	1,915	2,066	2,255	2,679	2,925	3,226	3,481
VLB- ЭН III	1,245	1,302	1,868	1,962	2,292	2,802	3,009	3,283	3,491
VLB- ЭН IV	1,189	1,321	1,849	2,075	2,245	2,698	2,972	3,198	3,604

*Abs- контрольных эритроцитов - 0,109

Полученные результаты демонстрируют, что хранение ТИА инкапсулированных ЭН при +4 °C в Na-фосфатном буфере является оптимальным. В дальнейшем рассматривались характеристики изменения ТИА-ЭН при хранении только при данной температуре. Результаты представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19. Степень гемолиза ТИА инкапсулированных ЭН при хранении при +4 °C

Форма ЭН	Время хранения (недели)			
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
Эритроциты	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
VLB-Ery-I	1,1481	2,2148	5,0667	14,7630
VLB-Ery-II	1,1704	2,2519	5,0963	14,5444

VCR-ПЭГ-4000 (1:5)	1,0185	1,9889	4,1778	11,1741
VCR-ПЭГ-4000 (1:10)	1,0407	2,0074	4,2185	11,3259
VCR-ПЭГ-4000 (1:20)	1,0481	2,0407	4,4667	11,4407
VCR-ПЭГ-4000 (1:50)	1,0667	2,1000	4,5889	11,7296
VCR-ПЭГ-4000 (1:100)	1,1037	2,1926	4,5259	12,1296
VLB-ПЭГ-4000 (1:10)	1,0222	1,9963	4,6148	12,5444
VLB-ПЭГ-4000 (1:20)	1,0407	2,0333	4,7481	11,1667
VLB-ПЭГ-400 (1:20)	1,0481	2,0037	4,4111	11,5259
VLB-ПЭГ-4000 (1:50)	1,1074	2,2148	4,7370	12,1667
VLB-ПЭГ-4000 (1:100)	1,1185	2,2370	4,8222	12,4630
VCR-АТФ	1,1037	2,5704	5,3852	13,3630
VLB-АТФ	1,1333	2,6222	5,563	13,9852
VCR-ДМСО	1,0704	2,1333	5,1556	11,5148
VLB-ДМСО	1,0593	2,1556	5,1926	11,7889

*Abs- контрольных эритроцитов – 0,270

Таблица 20. Количественное содержание (%) инкапсулированных ТИА после хранения при +4 °С

Форма ЭН	Инкапсулированное количество ТИА (мкг)	Дни хранения			
		1	3	7	14
VCR-ЭН I	873,475	99,11	-	-	-
VCR-ЭН II	846,866	-	98,18	-	-
VCR-ЭН III	859,277	-	-	95,31	-
VCR-ЭН IV	893,068	-	-	-	20,99
VCR-ПЭГ-1:20	1078,869	99,01	-	-	-
VCR-ПЭГ-1:20	1026,908	-	98,93	-	-
VCR-ПЭГ-1:20	1059,131	-	-	97,50	-
VCR-ПЭГ-1:20	1024,685	-	-	-	29,91
VCR-ДМСО	1246,908	99,19	-	-	-
VCR-ДМСО	1179,731	-	98,72	-	-
VCR-ДМСО	1248,668	-	-	97,06	-
VCR-ДМСО	1206,786	-	-	-	23,66
VLB-ЭН I	891,733	99,29	-	-	-
VLB-ЭН II	871,727	-	98,19	-	-
VLB-ЭН III	911,738	-	-	95,97	-
VLB-ЭН IV	906,678	-	-	-	21,31
VLB-ПЭГ 1:20	1057,178	99,01	-	-	-
VLB-ПЭГ 1:20	1091,378	-	98,69	-	-
VLB-ПЭГ 1:20	1089,116	-	-	97,38	-
VLB-ПЭГ 1:20	1096,543	-	-	-	28,99
VLB-ДМСО	1291,731	98,95	-	-	-
VLB-ДМСО	1269,173	-	98,49	-	-
VLB-ДМСО	1209,156	-	-	97,19	-
VLB-ДМСО	1245,867	-	-	-	23,94

*Количества ТИА препаратов, применяемых для инкапсулирования – 2000 мкг

Таблица 21. Метрологические характеристики среднего результата количественного содержания инкапсулированных ТИА после хранения при +4 °С

Метрологические характеристики среднего результата (\bar{x})			
Количественное содержание инкапсулированных ТИА в ЭН после хранения при +4 °С (%)			
1 д.	3 д.	7 д.	14 д.

$\bar{x} = 99,09\%$ $s^2 = 0,02; SD = 0,128$ $RSD = 0,00129$ $\Delta\bar{x} = 0,1344; \xi = 0,14\%$	$\bar{x} = 98,53\%$ $s^2 = 0,092; SD = 0,303$ $RSD = 0,0031$ $\Delta\bar{x} = 0,32; \xi = 0,32\%$	$\bar{x} = 95,96\%$ $s^2 = 0,1859; SD = 0,43$ $RSD = 0,0045$ $\Delta\bar{x} = 0,45; \xi = 0,47\%$	$\bar{x} = 24,80\%$ $s^2 = 14,49; SD = 3,81$ $RSD = 0,1535$ $\Delta\bar{x} = 3,99; \xi = 16,11\%$
--	--	--	--

Полученные данные свидетельствуют, что выдерживание ТИА инкапсулированной эритроцитарной формы при +4 °С является оптимальным условием для хранения ЭФ-ТИА препаратов. При хранении количественное содержание ТИА препаратов в эритроцитах изменяется. Установлено, что после 3 дней хранения ЭН, содержание ТИА в них, в среднем, составляет 98,54% ± 0,32; после 7 дней - 95,96% ± 0,52, а после 14 дней - 24,80% ± 3,99 (P = 95%) от инкапсулированной дозы (относительная погрешность среднего результата (ξ) не превышала 16,11%). На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что максимальная продолжительность хранения ТИА инкапсулированных ЭН при +4 °С составляет 7 дней, без уменьшения их терапевтической дозы ниже 95% от инкапсулированных количеств ТИА препаратов (таблица 20).

ВЫВОДЫ:

1. Разработана спектрофотометрическая методика качественного и количественного определения VCR и VLB в субстанциях и лекарственных формах.
2. В проведенном исследовании с применением модифицированного метода гипотонического лизиса с предварительным набуханием получены стабильные инкапсулированные эритроцитарные формы VCR и VLB.
3. Разработана методика количественного определения VCR и VLB в клеточных формах после предварительной очистки биоматериалов с помощью гель-хроматографии, позволяющая стандартизовать их по содержанию действующего вещества.
4. Установлено, что использование модифицированных сред при инкапсулировании ТИА препаратов, повышает эффективность загрузки ЭН на 5-7% для АТФ, 10-15% для ПЭГ-4000 и ПЭГ-400 (1:20) и на 15-20% для ДМСО.
5. Изучены особенности морфологии и физико-химические свойства ЭН после загрузки их ТИА. Установлено, что процесс инкапсулирования VCR и VLB в ЭН оказывает незначительное влияние на изменение некоторых показателей. Восстановление ЭН после загрузки составило 85,67%.
6. Установлена устойчивость клеточных форм VCR и VLB при хранении. Изучена степень десорбции и кинетика высвобождения ТИА в аутологичной плазме и изотоническом буфере в течение 6 часов.
7. Определены оптимальные условия и сроки хранения клеточных носителей, составлявшие – 7 суток при +4 °С; и клеточных эритроцитарных форм VCR и VLB - не более 3 суток при +4 °С.

Практические рекомендации. Компания «Эритех фарма» (EryTech Pharma Inc., USA) имеет интересную стратегию борьбы с раковыми заболеваниями. «Эритех фарма» развивает технологию Эрикапс (Erycaps), которая инкапсулирует терапевтические вещества внутри эритроцитов и создала препарат «Ery-ASP», получивший одобрение от FDA и EMA. Компания «EryDel SpA» является собственником технологии «Red Cell Loader» - полностью автоматизированного прикроватного биомедицинского оборудования

«EryDex System» для инкапсуляции эритроцитов методом гипотонического гемолиза с предварительным набуханием. Система EryDex (EDS) используется для загрузки дексаметазона натрия фосфата в аутологичные эритроциты, который вводится один раз в месяц пациенту. Эта тенденция демонстрирует, что в будущем фармацевтические компании будут создавать коммерческие продукты на основе эритроцитарных носителей. Поэтому методики, разработанные в данной работе, можно применить для инкапсулирования ТИА препаратов в эритроцитарные носители, что имеет огромное практическое значение для создания коммерческих препаратов VCR и VLB, осуществляющих их адресную доставку.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Представляется интересным исследовать возможности лиофилизирования ТИА инкапсулированных эритроцитарных форм для увеличения сроков их хранения. В перспективе возможно продление сроков их хранения после лиофильной сушки до 6 месяцев. Разработана также блок-схема аппарата автоматизированной системы для применения разработанной методики инкапсуляции ТИА препаратов в клинической практике.

Список работ, опубликованных по теме исследования:

1. Установление оптимальных условий для стандартизации винбластина методом спектрофотометрии / **А.Д. Халахакун** [и др.] // VI Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ». – 2016. – С. 573-575.
2. Установление оптимальных условий для стандартизации винкристина методом спектрофотометрии / **А.Д. Халахакун** [и др.] // VI Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ». – 2016. – С. 570-572.
3. **Халахакун, А.Д.** Возможности применения спектрофотометрического метода для стандартизации алкалоидных препаратов винкристина и винбластина в субстанциях и лекарственных формах / А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин, П.М. Карлов // Успехи современной науки. – 2017. – Vol. 6. – № 1. – С. 34-45.
4. **Халахакун, А.Д.** Изучение взаимодействия терпено-индольных алкалоидов с компонентами крови методом гель-фильтрации / А.Д. Халахакун, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Vol. 18. – № 2. – С. 176-184.
5. **Халахакун, А.Д.** Изучение стабильности и сроков годности клеточных форм терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина / А.Д. Халахакун, О.В. Тринеева // VII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ». - 2018. – С. 648-652.
6. **Halalahakoon, A.J.** Validated spectrophotometric method for the estimation of vincristine and vinblastine / A.J. Halalahakoon, S.A. Ivanovich, K.P. Mihailovich // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2017. – Vol. 9. – № 4. – P. 78. doi:10.22159/ijpps.2017v9i4.16577.
7. **Halalahakoon Mudiyansele Amila Jeewantha.** Systems for the delivery of chemotherapeutic drugs, new approaches and perspective / H.M.A. Jeewantha // Russian Open Medical Journal. – 2017. – Vol. 6. – № 3. doi:10.15275/rusomj.2017.0302.
8. Тринеева, О.В. Морфологические и физико-химические свойства эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпено-индольными алкалоидами / О.В. Тринеева, **А.Д. Халахакун**, А.И. Сливкин, Е.Е. Чупандина // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** - 2018. - №1(22). - С. 146-151.
9. Тринеева, О.В. Исследование стабильности клеточных носителей и клеточных форм винкристина и винбластина при хранении / О.В. Тринеева, **А.Д. Халахакун** // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** - 2018. - №2(23). – С. 110-114.
10. Тринеева, О.В. Оптимизация условий выделения терпено-индольных алкалоидов из биологического материала / О.В. Тринеева, **А.Д. Халахакун**, А.И. Сливкин // **Биофармацевтический журнал.** – 2018. –Т.10, №4. – С. 63-67.
11. Тринеева, О.В. Клеточные носители как системы доставки противоопухолевых лекарственных средств (обзор) / О.В. Тринеева, **А.Д. Халахакун** // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** - 2019. - №1(24). – (принята в печать).

12. Тринеева, О.В. Получение иммобилизованных клеточных форм противоопухолевых препаратов винкристина и винбластин / О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин, Е.Е. Чупандина // **Фармация**. – 2018. - №4, Т.67 – С. 23-28.
13. Тринеева, О.В. Изучение возможности увеличения эффективности «загрузки» эритроцитов противоопухолевыми терпено-индольными алкалоидами / О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин // **Фармация**. – 2018. - №7, Т.67 – (принята в печать).
14. Тринеева, О.В. Изучение морфологии эритроцитарных носителей, инкапсулированных противоопухолевыми алкалоидами / О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун // VIII Всероссийская конференция «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах — ФАГРАН-2018». – Воронеж, 8 - 11 октября 2018 г. – С. 583-585. <http://www.fagran.vsu.ru>
15. Halahakoon Mudiyansele Amila Jeewantha. The terpene-indole alkaloids loaded erythrocytes as a drug carrier: design and assessment / H.M.A. Jeewantha, Slivkin A.I. // **Russian Open Medical Journal**. – 2018. – Vol. 7. – № 4. Article CIDE0406 doi: 10.15275/rusomj.2018.0406 (Accepted 22 June 2018).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат;	ТИА - терпено-индольные алкалоиды;
ДМСО - диметилсульфооксид (dimethyl sulfoxide);	ЭН - эритроцитарные носители;
DMSO);	В.Ph. - Британская фармакопея;
КН – клеточные носители;	<i>C. roseus</i> - Катарантус розовый (<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don);
ЛС - лекарственные средства;	Е.Ph. - Европейская фармакопея (European Pharmacopoeia);
НД – нормативная документация;	Я.Ph. - Японская фармакопея (Japanese Pharmacopoeia);
ОРЭ - осмотической резистентности эритроцитов;	VCR - винкристин (vincristine, син: leurocristine);
ППЭМ - проницаемость мембран эритроцитов;	VLB - винбластин (vinblastine, син: vincalucoblastine)
ПЭГ - полиэтиленгликоль (polyethylene glycol);	
РЕГ);	
СДЛС - системы доставки лекарственных средств;	

Халахакун Мудиянселлаге Амила Дживанта Халахакун

(Демократическая Социалистическая Республика Шри-Ланка)

ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНО-ИНДОЛЬНЫМИ АЛКАЛОИДНЫМИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Онкологические заболевания, остаются одними из самых опасных. Согласно данным ВОЗ наблюдается 10 миллионов новых случаев каждый год. Противоопухолевая химиотерапия – один из важнейших и наиболее динамично развивающихся отделов современной онкологии. В настоящее время противоопухолевая химиотерапия применяет различные режимы и различные группы противоопухолевых препаратов (антиметаболиты, цитостатики, алкилирующие соединения и др.). Противоопухолевые препараты растительного происхождения винкристина и винбластин (VCR и VLB), которые относятся к терпено-индольным алкалоидам (ТИА) *C. roseus* обладают высокой цитостатической активностью. Их низкое избирательное действие на опухоль приводит к воздействию лекарственных средств (ЛС) на многие здоровые органы и ткани в организме пациента. В противоопухолевой химиотерапевтической практике VCR и VLB применяются в моно- и комбинированных режимах и схемах при лечении различных раковых заболеваний. Несмотря на их эффективность, имеется ряд побочных эффектов, которые ограничивают применения этих препаратов. Цели современной фармацевтической науки и производства направлены на улучшение фармакокинетического профиля ТИА препаратов для: уменьшения побочного действия, создания целенаправленной доставки ТИА препаратов через контролируемые системы доставки ЛС (СДЛС), использование нанотехнологий в создании новых видов лекарственных форм (липосомальные формы, мицеллы, дендримеры, микрочастицы, наночастицы) и др. Актуальным является поиск и разработка путей уменьшения нежелательных эффектов ТИА препаратов в организме и улучшение переносимости и эффективности химиотерапии. В течение последних нескольких десятилетий технология, контролирующая доставку ЛС, существенно продвинулась, что приводит к развитию различных способов для улучшения качества доставки ЛС. При этом очень важное значение имеет разработка методик для их стандартизации и контроля качества. В литературе в настоящее время отражены основные аспекты теории и практики направленного транспорта лекарственных веществ, рассмотрены поколения лекарственных форм, с помощью которых осуществляется доставка лекарственных веществ к органу-мишени. Одними из самых эффективных и доступных для применения (без-

опасность, техническая простота, быстрое достижение клинических результатов при относительно низкой себестоимости проводимых процедур) представляются методы направленного транспорта ЛС, предполагающие использование аутологичных клеток крови в качестве переносчиков препаратов. Большинство рассмотренных методов пока находится на стадии разработки и некоторые методы постепенно находят практическое применение за рубежом в медицине и др. областях. Существует возможность использования клеточных носителей (КН) в качестве системы доставки VCR и VBL. В научных публикациях пока отсутствуют данные о применении КН для инкапсулирования VCR и VBL. Поэтому актуальны исследования, посвящённые возможности применения КН для уменьшения побочных эффектов, улучшения эффективности и разработки лекарственных форм доставки VCR и VBL в патологические очаги.

Halahakoon Mudiyansele Amila Jeewantha Halahakoon

(The Democratic Socialist Republic of Sri Lanka)

THE OBTAINED AND STANDARDIZATION OF ENCAPSULATED ERYTHROCYTES CARRIER WITH TERPENE-INDOLES ALKALOIDS ANTICANCER DRUGS

Oncological diseases remain one of the most dangerous. According to WHO, there are 10 million new cases every year were reported. Antitumor chemotherapy is one of the most important and fastest growing departments of modern oncology. Currently, in anticancer chemotherapy uses different modes and various groups of anticancer drugs (antimetabolites, cytostatic, alkylating compounds, etc.). Anticancer drugs of plant origin vincristine and vinblastine (VCR and VLB), which belong to the terpene-indole alkaloids (TIAs) of *C. roseus* are subject to highly cytostatic activity. Their low selective effect on the tumor leads to the effects of drugs on many healthy organs and tissues in the patient's body. In antitumor chemotherapy practice, VCR and VLB are used in mono- and combined schemes and regimens in the treatment of various cancer types. Despite their effectiveness, there are numbers of side effects that limit the use of these drugs. The goals of modern pharmaceutical science and production are aimed at improving the Pharmacokinetic Profile of TIAs drugs for: reducing side effects, targeted delivery of TIAs drugs through controlled drug delivery systems (CDDS), use nanotechnology in the formation of new types of dosage forms (liposomal forms, micelles, dendrimer, microparticles, nanoparticles), etc. The search and development of ways to reduce the adverse effects of TIAs drugs in the body and improve the tolerability and effectiveness of chemotherapy is Relevant project. Over the past few decades, the technology controlling the delivery of drugs has advanced significantly, which leads to the development of various ways to improve the quality of drug delivery. It is very important to develop methods for their standardization and quality control. The literature currently reflects the basic aspects of the theory and practice of the directed transport of drugs, the generation of dosage forms, through which the delivery of drugs to the target organ is carried out. One of the most effective and accessible for use (safety, technical simplicity, rapid achievement of clinical results at a relatively low cost of the procedures) are methods of directed transport of drugs, involving the use of auto-logical blood cells as carriers of drugs. Most of the considered methods are still under development and some methods are gradually finding practical application abroad in medicine and other fields. It is possible to use cellular carriers (CC) as a delivery system for VCR and VBL. Scientific publications do not yet have data on the use of CC for encapsulation of VCR and VBL. Therefore, relevant research on the possibility of the use of CC to reduce side effects, improve the efficiency and development of dosage forms of delivery of VCR and VBL in pathological foci.