

ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ НАНОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ PLGA НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЖДУ ПЛАЗМОЙ И ЭРИТРОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Т.С. Ковшова

аспирант, кафедра фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; науч. сотрудник, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)
E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

Н.С. Осипова

науч. сотрудник,
Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)

А.В. Белов

к.х.н., науч. сотрудник,
Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)

О.О. Максименко

к.х.н., науч. сотрудник,
Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)

В.Ю. Балабаньян

д.фарм.н., вед. науч. сотрудник,
лаборатория генных и клеточных технологий, факультет фундаментальной медицины,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва)

С.Э. Гельперина

д.х.н., профессор кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов,
Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева (Москва)

Актуальность. Одной из особенностей фармакокинетики наносомальных форм лекарственных веществ (ЛВ) является различное распределение свободного и связанного с носителем ЛВ (наночастицы, липосомы) между плазмой и форменными элементами крови.

Цель работы. Оценка связывания *in vitro* с эритроцитами крови человека нагруженных доксорубицином наночастиц (НЧ) на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), модифицированных полоксамером 188 (Dox-PLGA), в концентрации 10–100 мкг/мл; изучение влияния физико-химических параметров НЧ на степень связывания с эритроцитами.

Материал и методы. Dox-PLGA НЧ получены методом «двойных эмульсий». В качестве внешней водной фазы использовали 1%-ный раствор поливинилового спирта в фосфатном буфере при pH 7,4 (Dox-PLGA/7,4) и 6,4 (Dox-PLGA/6,4). Для получения отмытых НЧ Dox-PLGA/7,4(G-25) и Dox-PLGA/6,4(G-25) не связанный с НЧ доксорубин отделяли с помощью гель-фильтрации. Кинетику высвобождения доксорубина из НЧ *in vitro* определяли в 1%-ном растворе полоксамера 188. Для оценки связывания данных лекарственных форм с эритроцитами крови рассчитывали коэффициенты распределения $K_{RBC/Plasma}$ (эритроциты – плазма) и $K_{Blood/Plasma}$ (цельная кровь – плазма) после инкубации в цельной крови в течение 5, 15 и 30 мин. Содержание доксорубина в плазме оценивали методом ВЭЖХ.

Результаты. Наночастицы Dox-PLGA/6,4 (средний размер 142 ± 2 нм) по сравнению с Dox-PLGA/7,4 (средний размер 114 ± 1 нм) отличались более низкой степенью включения ($79,7 \pm 1,1\%$ vs $91,0 \pm 0,7\%$ соответственно) и более высокой скоростью высвобождения доксорубина *in vitro*. Рассчитанное на основании значений $K_{Blood/Plasma}$ общее количество доксорубина, связанного с эритроцитами после 5 мин инкубации, составило $\sim 33\%$ для данных наносомальных форм и свободного доксорубина (контроль) во всем диапазоне концентраций. Равновесная степень связывания (через 15 мин инкубации) составила 58–63% для свободного доксорубина, 57–58% для Dox-PLGA/6,4 и 46–49% PLGA/7,4. Наночастицы Dox-PLGA/6,4(G-25) обладали самой низкой равновесной степенью связывания с эритроцитами крови ($\sim 34\%$).

Выводы. В эксперименте *in vitro* включенный в наночастицы Dox-PLGA доксорубин в концентрации 10–100 мкг/мл связывается с эритроцитами крови человека в меньшей степени, чем свободный доксорубин, причем чем выше степень включения и нагрузка доксорубина в НЧ, тем меньше значение коэффициентов распределения доксорубина между эритроцитами и плазмой крови ($K_{Blood/Plasma}$ и $K_{RBC/Plasma}$).

Ключевые слова: наночастицы, PLGA, доксорубин, степень включения, связывание с эритроцитами.

Для цитирования: Ковшова Т.С., Осипова Н.С., Белов А.В., Максименко О.О., Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. Влияние параметров наносомальной формы доксорубина на основе PLGA на распределение между плазмой и эритроцитами крови человека. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(8):11–18.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2020-08-02>

Биосовместимые и биodeградируемые сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) в настоящее время активно изучаются в доклинических и клинических исследованиях с целью получения наносомальных лекарственных форм (НЛФ) для парентерального введения [1]. Нагруженные доксорубицином PLGA наночастицы (НЧ), модифицированные полоксамером 188 (Dox-PLGA), ранее показали высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс [2]. Включение доксорубицина в НЧ также позволило снизить его кардиотоксичность [3]. Кроме того, Dox-PLGA НЧ в диапазоне концентраций 0,1–100 мкг/мл не оказывали влияния на свертывающую систему крови и не вызывали гемолиз эритроцитов в эксперименте *in vitro* [4]. Однако влияние физико-химических параметров Dox-PLGA НЧ и профиля высвобождения доксорубицина на фармакокинетику (ФК) этой НЛФ до настоящего времени не изучено. Одной из особенностей ФК НЛФ является различное распределение свободного и связанного с носителем лекарственных веществ (ЛВ) между плазмой и форменными элементами крови, в частности эритроцитами.

Цель исследования – оценка связывания *in vitro* с эритроцитами крови человека нагруженных доксорубицином PLGA НЧ, модифицированных полоксамером 188 (Dox-PLGA), в концентрации 10–100 мкг/мл и изучение влияния физико-химических параметров НЧ на степень связывания с эритроцитами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал. В работе использованы: доксорубин гидрохлорид (99,0%, Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals, Hong Kong, Китай), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA, Resomer® 502H, соотношение лактид-гликолид 50:50, Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия), поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80%, Sigma, Германия), полоксамер 188 (Kolliphor® P 188, BASF, Германия). Фосфатный буфер готовили с использованием таблеток PBS (MP Biomedicals, LLC, США). Для ВЭЖХ анализа использовали ацетонитрил (АЦН) 99,9%, ортофосфорную кислоту 85% и додецилсульфат натрия (Pan Reac Applichem, Германия), стандарты даунорубицина гидрохлорида (EP CRS, 98,5%, EDQM) и доксорубицина гидрохлорида (EP CRS, 99,0%, EDQM). Все другие реагенты, включая дихлорме-

тан (ДХМ) и диметилсульфоксид (ДМСО), соответствовали квалификации ч.д.а.

Получение Dox-PLGA НЧ. Наночастицы Dox-PLGA получены методом «двойных эмульсий» как описано ранее [4]. Раствор 60 мг доксорубицина гидрохлорида в 2,4 мл 0,001 н. соляной кислоты эмульгировали с органической фазой (600 мг PLGA в 3,6 мл ДХМ) при помощи гомогенизатора (Ultra-Turax T18 Basic, IKA, Германия). Полученную первичную эмульсию (м/в) смешивали с 30 мл внешней водной фазы и гомогенизировали вначале с помощью диспергатора Ultra-TuraxT18, а затем – гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США). В качестве внешней водной фазы использовали 1%-ный раствор ПВС в фосфатном буфере при pH 7,4 (Dox-PLGA/7,4) и 6,4 (Dox-PLGA/6,4). Органический растворитель удаляли под вакуумом, полученную наносuspension пропускали через стеклянный фильтр, добавляли маннит в качестве криопротектора (5%, об/масс.) и лиофильно высушивали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия).

Получение Dox-PLGA НЧ, отмытых от свободного доксорубицина. Свободный доксорубин отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G-25, GE Healthcare, Швеция; колонка 32×110 мм, объем геля ~ 70 мл) для получения Dox-PLGA/7,4(G-25) и Dox-PLGA/6,4(G-25) НЧ. Для этого 10–12 мл сконцентрированной в 2 раза суспензии Dox-PLGA НЧ наносили на колонку для гель-фильтрации, затем фракцию отмытых НЧ собирали и лиофильно высушивали как описано выше.

Для модификации поверхности НЧ полоксамером 188 (P188) лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1%-ном растворе P188 и инкубировали в течение 30 мин перед проведением дальнейших исследований.

Изучение физико-химических параметров Dox-PLGA. Средний гидродинамический диаметр частиц, распределение частиц по размерам (PDI) и ζ-потенциал поверхности НЧ устанавливали с помощью Zetasizer Nano ZS, (Malvern Instruments, Великобритания). Общее содержание доксорубицина в НЧ определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1800, Япония) при длине волны 480 нм после растворения лиофилизата НЧ в ДМСО, общее содержание PLGA – методом капиллярного электрофореза после щелочного гидролиза как описано в [5]. Степень включения доксорубицина в НЧ оценивали косвенно путем спектрофотометриче-

ского определения свободного доксорубина в супернатантах после отделения НЧ ультрацентрифугированием (48254×g, Avanti JXN-30, Beckman Coulter, США) и рассчитывали как отношение (в процентах) разницы содержания общего и свободного доксорубина к его общему содержанию в образце. Нагрузку доксорубина в НЧ (в процентах) рассчитывали как отношение массы доксорубина, связанного с НЧ, к массе НЧ (масса PLGA в образце).

Изучение профиля высвобождения доксорубина из Dox-PLGA НЧ *in vitro*. Кинетику высвобождения доксорубина из НЧ *in vitro* определяли в 1%-ном растворе Р188 без смены среды при разбавлении суспензии лиофилизированных НЧ до концентрации доксорубина ≈ 68 мкг/мл и конечного объема 25 мл с последующей инкубацией при 37 °С при непрерывном встряхивании. Через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 4, 6, 24 и 48 ч) НЧ отделяли центрифугированием (48254×g) и определяли содержание доксорубина в супернатанте спектрофотометрически ($\lambda_{\max}=480$ нм), $n=3$.

Изучение связывания Dox-PLGA НЧ с эритроцитами крови человека. Чтобы оценить и сравнить связывание свободного и наносомального доксорубина с эритроцитами крови человека, рассчитывали коэффициенты распределения $K_{\text{RBC/Plasma}}$ и $K_{\text{Blood/Plasma}}$ по адаптированному протоколу, описанному в [6]. Для этого свежесобранную кровь трех здоровых доноров, взятую в пробирки с антикоагулянтом (КЗ-EDTA), инкубировали при 37 °С в течение 10 мин. Для получения контрольной плазмы эритроциты отделяли путем центрифугирования цельной крови (1500×g, 10 мин, 20 °С). Далее 100 мкл суспензии нагруженных доксорубином PLGA НЧ (отмытых/не отмытых от свободного доксорубина) или раствора доксорубина гидрохлорида (DOX, контроль) в 1%-ном Р 188 добавляли к 1 мл отобранной цельной крови и контрольной плазме до конечной концентрации 10, 50 или 100 мкг/мл (доксорубин) и инкубировали при 37 °С при постоянном перемешивании (150 об/мин). Через заданные интервалы времени (5, 15, 30 мин) цельную кровь центрифугировали (1500×g, 10 мин, 20 °С) и отбирали 220 мкл плазмы (b-плазма). К 220 мкл b-плазмы добавляли 80 мкл раствора даунорубина с концентрацией 40 мкг/мл в качестве внутреннего стандарта (ВС) и экстрагировали доксорубин и ВС из плазмы смесью АЦН и ДМСО (1:1) с добавлением 0,1%-ной муравьиной кислоты (МК) в течение 10 мин с последующим

отделением белков центрифугированием (4000 об/мин, 30 мин, 5 °С, Eppendorf 5804R, Германия). Супернатант разбавляли смесью АЦН:вода MilliQ (62,5:37,5, об/об) с добавлением 0,1%-ной МК и затем анализировали содержание доксорубина с помощью ВЭЖХ (HPLC Shimadzu System, колонка Symmetry C18, 5 мкм, 3,9×150 мм) со спектрофотометрическим детектированием ($\lambda_{\max}=254$ нм). Подвижная фаза состояла из буфера (2,88 г/л додецилсульфата натрия и 2,25 г/л ортофосфорной кислоты) и АЦН в соотношении 51:49 (скорость потока ПФ 1,0 мл/мин, температура колонки 25 °С). Концентрации доксорубина в плазме были рассчитаны в соответствии с калибровочной кривой, построенной по стандарту доксорубина гидрохлорида с нормализацией по ВС, по уравнению в диапазоне концентраций 2–100 мкг/мл:

$$\frac{S_{\text{докс}}}{S_{\text{ВС}}} = 0,0628 \times C_{\text{докс}} + 0,0219 (R^2 = 0,9999), \quad (1)$$

где $\frac{S_{\text{докс}}}{S_{\text{ВС}}}$ – отношение площади пика доксорубина к пику внутреннего стандарта; $C_{\text{докс}}$ [мкг/мл].

Предел количественного определения составлял 1,95 мкг/мл, коэффициент вариации прецизионности и точности – менее 15%, степень извлечения составила 96–104%. Контрольные образцы анализировали аналогично. Коэффициенты $K_{\text{RBC/Plasma}}$ и $K_{\text{Blood/Plasma}}$ рассчитывали по уравнениям:

$$K_{\text{RBC/Plasma}} = \frac{1}{H_t} \times \left(\frac{C_{\text{cp}}}{C_p} - 1 \right) + 1, \quad (2)$$

$$K_{\text{Blood/Plasma}} = \frac{C_{\text{cp}}}{C_p}, \quad (3)$$

где C_{cp} – концентрация доксорубина в контрольной плазме; C_p – концентрация доксорубина в b-плазме; H_t – гематокрит (0,4).

Связывание с эритроцитами доксорубина (в процентах) после инкубирования в цельной крови определяли исходя из полученных значений $K_{\text{Blood/Plasma}}$:

$$\begin{aligned} \text{Связывание с эритроцитами (\%)} &= \\ &= \left(1 - \frac{1 - H_t}{K_{\text{Blood/Plasma}}} \right) \times 100\%. \end{aligned} \quad (4)$$

Все измерения повторяли три раза.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета анализа данных Statsoft Statistica 10. Для статистического анализа физико-химических данных использовали *t*-критерий Стьюдента; статистический уровень значимости $p < 0,05$. Полученные результаты представлены как средние значения \pm стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что растворимость амфифильной молекулы доксорубина зависит от значения pH среды: в более кислой среде происходит протонирование аминогруппы, и ионное равновесие смещается в сторону образования более растворимых в воде катионов, что снижает сродство молекулы доксорубина к матрице PLGA и приводит к снижению степени включения доксорубина в НЧ [7]. Варьирование pH внешней водной фазы при образовании

эмульсии (в/м/в) позволяет получить нагруженные доксорубином НЧ PLGA с различными физико-химическими свойствами. Так, средний размер НЧ, полученных при pH 7,4 (Dox-PLGA/7,4) и pH 6,4 (Dox-PLGA/6,4), составил 114 ± 1 нм (ζ -потенциал $-9,5 \pm 0,2$ мВ) и 142 ± 2 нм (ζ -потенциал $-4,8 \pm 0,3$ мВ) соответственно. Наночастицы Dox-PLGA/6,4, по сравнению с Dox-PLGA/7,4, отличались более низкой степенью включения (табл. 1) и более высокой скоростью высвобождения доксорубина *in vitro* (рис. 1). После отделения свободного (не связанного с НЧ доксорубина) с помощью гель-фильтрации средний размер наночастиц Dox-PLGA/7,4 (G-25) и Dox-PLGA/6,4 (G-25) не изменился, однако ζ -потенциал приобрел более отрицательные значения за счет десорбции доксорубина с поверхности НЧ и составил $-21,0 \pm 1,3$ мВ и $-20,9 \pm 0,6$ мВ соответственно. При этом нагрузка доксорубина в НЧ особенно уменьшилась для НЧ, полученных при pH 6,4.

Таблица 1. Физико-химические характеристики наночастиц PLGA, нагруженных доксорубином (средние значения \pm sd), n=3

Образец наночастиц	Степень включения доксорубина, %	Нагрузка доксорубина, %
Dox-PLGA/7,4	91,0 \pm 0,7	9,1 \pm 0,3
Dox-PLGA/6,4	79,7 \pm 1,1	7,8 \pm 0,1
Dox-PLGA/7,4(G-25)	97,6 \pm 0,6	7,3 \pm 0,2
Dox-PLGA/6,4(G-25)	97,7 \pm 0,4	2,6 \pm 0,1

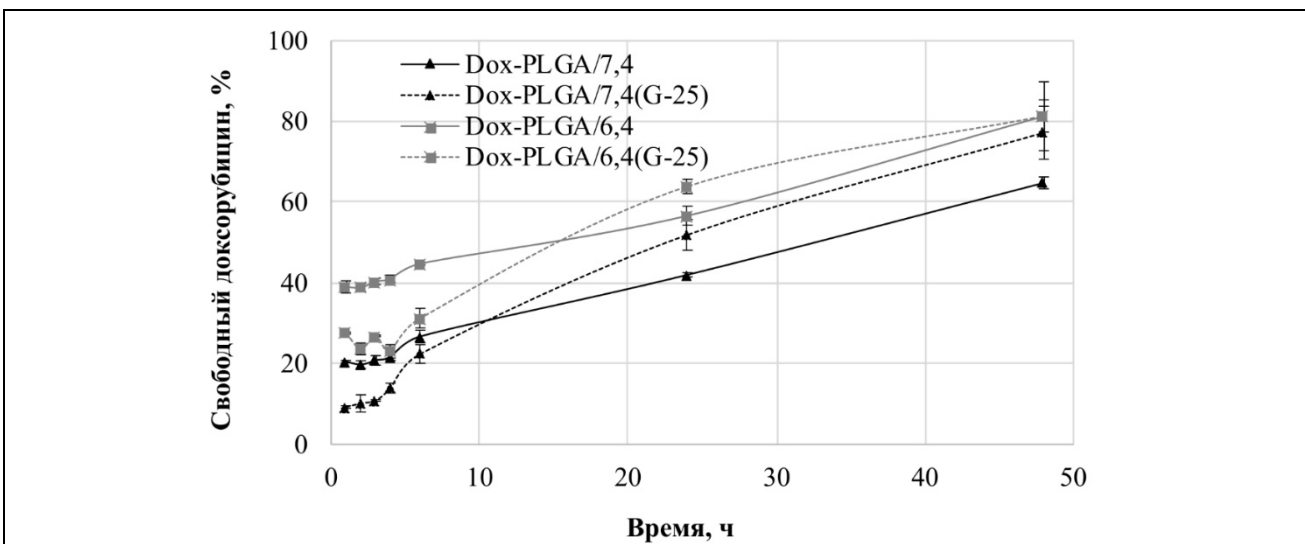


Рис. 1. Профили высвобождения доксорубина из PLGA наночастиц, нагруженных доксорубином, в 1%-ном растворе полоксамера 188; среднее значение \pm SD; n = 3

При изучении профиля высвобождения доксорубина в 1%-ном растворе Р 188 (разведение ~ в 25 раз) для отмытых от свободной фракции доксорубина НЧ также наблюдается высвобождение доксорубина в первые часы, что свидетельствует о десорбции и диффузии доксорубина из приповерхностных слоев НЧ при значительном разбавлении, даже если свободная фракция доксорубина была предварительно удалена.

Фармакокинетические параметры лекарственных форм обычно определяют путем анализа концентрации ЛВ в плазме, а не в цельной крови. В то же время в тех случаях, когда взаимодействие свободного и связанного с НЧ ЛВ со специфическими компонентами крови, в том числе эритроцитами, различаются, для получения точных данных необходимо определение концентраций в цельной крови. Известно, что некоторые полимерные НЧ размером 100–200 нм способны нековалентно адсорбироваться на поверхности эритроцитов и оставаться связанными с ней продолжительное время, при этом решающую роль в процессе такого взаимодействия играют заряд и функциональные группы на поверхности НЧ. Так, в эксперименте [8] сорбция гидрофильных отрицательно заряженных НЧ на поверхности эритроцитов не наблюдалась. Таким образом, можно было ожидать, что и связывание Dox-PLGA НЧ с эритроцитами крови также будет незначительным, а общая концентрация доксорубина в плазме при инкубации данных наносомальных форм в крови будет существенно выше, чем при инкубации субстанции доксорубина.

В данном исследовании параметры связывания с эритроцитами, а именно отношение концентрации доксорубина в крови к его концентрации в плазме ($K_{\text{Blood/Plasma}}$) и отношение концентрации доксорубина в эритроцитах к его концентрации в плазме ($K_{\text{RBC/Plasma}}$), были определены для Dox-PLGA/7,4 и Dox-PLGA/6,4 в сравнении с субстанцией (DOX, контроль) по методу [6] в диапазоне 10–100 мкг/мл по доксорубину через 5, 15 и 30 мин инкубации в цельной крови. Параметры связывания также были определены для НЧ, отмытых от свободной фракции доксорубина. Как правило, для определения концентрации ЛВ в плазме и эритроцитах препарат инкубируют в крови, а затем разделяют плазму и эритроциты с последую-

щим определением ЛВ в обеих фракциях [9–11]. В проведенном исследовании для расчета параметров связывания (уравнения 2 и 3), концентрации ЛВ определяли в контрольной плазме (C_{cp}) и в-плазме (C_{p}), полученной после инкубации препарата в цельной крови. При этом предполагали, что свободный доксорубин, который изначально присутствует в суспензии НЧ и дополнительно высвобождается при введении в кровь, распределяется между кровью и эритроцитами в соотношении, рассчитанном для контроля (Dox). Поэтому в случае наносомальных форм в плазме определяли именно суммарную концентрацию доксорубина (свободного и связанного с НЧ), чтобы можно было косвенно оценить сколько доксорубина, связанного с НЧ, отделяется с эритроцитами при разделении крови. Метод [6] позволяет получать значения коэффициентов связывания ЛВ с эритроцитами, близкие к значениям, определенным традиционным методом [9–11], при котором требуется проводить гемолиз цельной крови и эритроцитов и определять ЛВ в разных матрицах. Однако в этом случае необходимо ограничивать время инкубации интервалом, в котором стабильность ЛВ в контрольной плазме и цельной крови одинакова в условиях эксперимента.

Согласно литературным данным, доксорубин обладает высоким связыванием с эритроцитами ($K_{\text{RBC/Plasma}} > 2$), при этом степень связывания отличается в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и зависит от дозы. Так, например, равновесное значение $K_{\text{Blood/Plasma}}$ для доксорубина *in vivo* у морских свинок составило $2,4 \pm 0,09$ [10]. При внутривенном введении доксорубина крысам в дозе 10 мг/кг с эритроцитами связывается 50% введенного препарата [11]. Для таких ЛВ рекомендовано определение ФК параметров в цельной крови, однако при условии постоянства константы распределения на всем ожидаемом диапазоне концентраций исследование может быть проведено и в плазме. Как показали результаты данного исследования, включенный в НЧ доксорубин связывается с эритроцитами медленнее и в меньшем количестве, чем свободный, причем во всех случаях равновесие наступает через 15 мин после начала инкубации, а величина констант распределения не зависит от исходной концентрации доксорубина (табл. 2).

Таблица 2. Значение коэффициентов распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами крови (средние значения \pm sd)

Вре- мя, мин	Параметры связывания	10 мкг/мл			50 мкг/мл			100 мкг/мл		
		DOX	Dox- PLGA/6,4	Dox- PLGA/7,4	DOX	Dox- PLGA/6,4	Dox- PLGA/7,4	DOX	Dox- PLGA/6,4	Dox- PLGA/7,4
5	$K_{RBC/Plasma}$	0,83\pm0,03	0,84 \pm 0,01	0,72 \pm 0,03	0,76\pm0,04	0,75 \pm 0,01	0,69 \pm 0,03	0,73\pm0,06	0,70 \pm 0,01	0,68 \pm 0,03
	$K_{Blood/Plasma}$	0,93\pm0,03	0,94 \pm 0,01	0,89 \pm 0,03	0,90\pm0,04	0,90 \pm 0,01	0,88 \pm 0,03	0,89\pm0,06	0,88 \pm 0,01	0,87 \pm 0,03
15	$K_{RBC/Plasma}$	2,15\pm0,02	1,94 \pm 0,04	1,42 \pm 0,03	2,42\pm0,05	2,10 \pm 0,03	1,28 \pm 0,04	2,53\pm0,03	2,07 \pm 0,05	1,42 \pm 0,03
	$K_{Blood/Plasma}$	1,46\pm0,02	1,38 \pm 0,04	1,17 \pm 0,03	1,57\pm0,05	1,44 \pm 0,03	1,11 \pm 0,04	1,61\pm0,03	1,43 \pm 0,05	1,17 \pm 0,03
30	$K_{RBC/Plasma}$	2,25\pm0,03	1,83 \pm 0,05	1,50 \pm 0,02	2,30\pm0,02	2,00 \pm 0,04	1,52 \pm 0,01	2,73\pm0,03	1,98 \pm 0,02	1,34 \pm 0,06
	$K_{Blood/Plasma}$	1,50\pm0,03	1,33 \pm 0,05	1,20 \pm 0,02	1,52\pm0,02	1,4 \pm 0,04	1,21 \pm 0,01	1,69\pm0,03	1,39 \pm 0,02	1,14 \pm 0,06

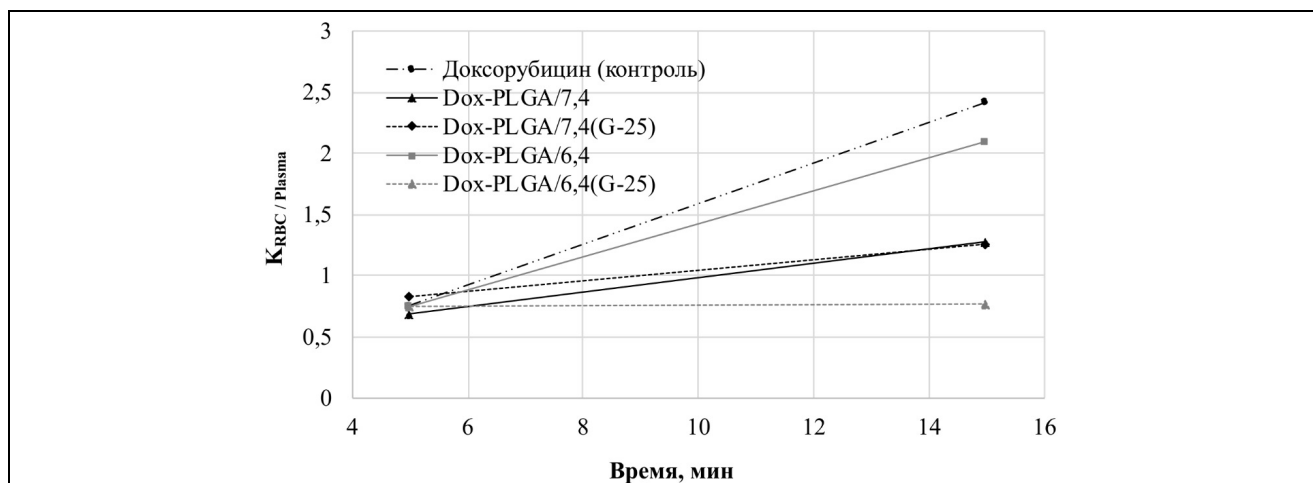


Рис. 2. Средние значения коэффициентов распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами после инкубации доксорубина (контроль) и наносомальных форм доксорубина в концентрации 50 мкг/мл в крови

На основании значений $K_{Blood/Plasma}$ было продемонстрировано, что общее количество связанного с эритроцитами доксорубина через 5 мин инкубации в крови (до наступления равновесия) для всех наносомальных форм не отличалось от контроля (Dox) и составило $33\pm 2\%$ ($p > 0,05$) во всем диапазоне концентраций.

Отмечено, что по равновесным параметрам распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами крови форма Dox-PLGA/6,4 близка к субстанции доксорубина, видимо, вследствие преимущественной сорбции доксорубина на по-

верхности НЧ в процессе получения и значительной десорбции с поверхности при попадании в кровь. Так, связывание с эритроцитами доксорубина через 15 мин инкубации в крови данных форм в концентрации 50 мкг/мл составило 58 ± 1 и $62\pm 1\%$ соответственно.

При этом для формы Dox-PLGA/7,4, отличающейся большей степенью включения доксорубина, в тех же условиях отмечено меньшее связывание с эритроцитами ($46\pm 1\%$), при этом в плазме остается больше доксорубина, чем в случае формы Dox-PLGA/6,4 или свободного док-

сорубицина ($p < 0,05$). Отмытые от несвязанного доксорубицина НЧ Dox-PLGA/6,4 (G-25) обладали самой низкой равновесной степенью связывания с эритроцитами крови (рис. 2). В этом случае связывание с эритроцитами оставалось таким же, каким было через 5 мин инкубации ($34 \pm 1\%$).

Таким образом, равновесные коэффициенты распределения доксорубицина между плазмой и форменными элементами крови зависели от степени включения и нагрузки доксорубицина в Dox-PLGA НЧ.

ВЫВОДЫ

1. Включенный в наночастицы на основе PLGA доксорубицин в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл связывается с эритроцитами человека в меньшей степени, чем свободный доксорубицин, причем чем выше степень включения и нагрузка доксорубицина в НЧ, тем меньше значение коэффициентов распределения доксорубицина между эритроцитами и плазмой крови ($K_{\text{Blood/Plasma}}$ и $K_{\text{RBC/Plasma}}$). Различие в связывании с эритроцитами между свободным и связанным с НЧ доксорубицином может таким образом оказывать влияние на ФК параметры при внутривенном введении.
2. Включение доксорубицина в НЧ позволяет повысить общую концентрацию доксорубицина в плазме после введения в кровь относительно субстанции при введении в одинаковой дозе по доксорубицину.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-015-00276.

Авторы выражают благодарность компаниям Evonik Nutrition & Care GmbH и CPH Pharmab.v. за предоставленный образец полимера Resomer® 502H.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wacker M. Nanocarriers for intravenous injection – the long hard road to the market. *Int. J. Pharm.* 2013; 457(1):50–62.
2. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A.S., Vanchugova L., Shipulo E. et al. Drug delivery to the brain using surfactant coated poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 74(2):157–163.
3. Pereverzeva E., Treschalin I.D., Treschalin M.I., Arantseva D. et al. Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *Int. J. Pharm.* 2019; 554:161–178.
4. Maksimenko O., Malinovskaya Ju., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V. et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int. J. Pharm.* 2019; 572: 118733.
5. Kumskova N., Ermolenko Yu., Osipova N., Semyonkin A., Kildeeva N. et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. *J. Microencapsul.* 2020; 37(3):283–295.
6. Yu S., Li Sh., Yang H., Lee F., Wu J. T., Qian M.G. et al. A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2005; 19(2):250–254.
7. Tewes F., Munnier E., Antoonet B., Okassa L.N., Cohen-Jonathan S. et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007; 66(3):488–492.
8. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V. et al. Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth. *Nanoscale.* 2019; 11(4):1636–1646.
9. Kalamaridis D., DiLoreto K. Drug partition in red blood cells. Optimization in Drug Discovery. Humana Press. Totowa, NJ. 2014; p. 39–47.
10. Terasaki T., Iga T., Sugiyama M., Hanano M. Pharmacokinetic study on the mechanism of tissue distribution of doxorubicin: interorgan and interspecies variation of tissue-to-plasma partition coefficients in rats, rabbits, and guinea pigs. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73(10):1359–1363.
11. Colombo T., Brogini M., Garattini S., Donelli M.G. Differential a driumycin® distribution to blood components. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1981; 6(2):115–122.

Поступила 14 мая 2020 г.

EFFECT OF THE PARAMETERS OF THE NANOPARTICULATE FORM OF DOXORUBICIN BASED ON PLGA ON THE DISTRIBUTION BETWEEN HUMAN BLOOD PLASMA AND RED BLOOD CELLS

© Authors, 2020

T.S. Kovshova

Post-graduate Student, M.V. Lomonosov Moscow State University;
Research Scientist, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)
E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

N.S. Osipova

Research Scientist, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)

A.V. Belov

Ph.D. (Chem.), Research Scientist, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)

O.O. Maksimenko

Ph.D. (Chem.), Research Scientist, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)

V.Yu. Balabanyan

Dr.Sc. (Pharm.), Leading Research Scientist, M.V. Lomonosov Moscow State University (Moscow)

S.E. Gelperina

Dr.Sc. (Chem.), Professor, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Moscow)

Relevance. One of the features of the pharmacokinetics of nanoparticle-based drug formulations is the different distribution of free and carrier-bound drugs (nanoparticles, liposomes) between plasma and blood cells.

Aim. Evaluation of in vitro binding of doxorubicin-loaded nanoparticles (NPs) based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) modified with poloxamer 188 (Dox-PLGA) to human red blood cells at a concentration of 10-100 µg/ml and the influence of physico-chemical parameters of NPs on their binding to red blood cells.

Material and methods. Dox-PLGA NPs were obtained by a "double emulsion" method. A 1% PVA solutions in phosphate buffer at pH 7.4 (Dox-PLGA/7.4) and 6.4 (Dox-PLGA/6.4) were used as the external aqueous phase. The purified Dox-PLGA/7.4(G-25) and Dox-PLGA/6.4(G-25) NPs were obtained by separation of the free fraction of doxorubicin (non-nanoparticle-bound) by gel filtration. The kinetics of doxorubicin release from NPs *in vitro* was determined in a 1% solution of poloxamer 188. To assess the binding of the NPs to red blood cells, the distribution coefficients $K_{RBC/Plasma}$ (red blood cells - plasma) and $K_{Blood/Plasma}$ (whole blood - plasma) were calculated after incubation in whole blood within 5, 15 and 30 minutes. The doxorubicin content in plasma was estimated by HPLC.

Results. Compared to the Dox-PLGA/7.4 NPs (average size 114±1 nm), the Dox-PLGA/6.4 NPs (average size 142±2 nm) had a lower encapsulation efficiency (79.7±1.1% vs 91.0±0.7%, respectively) and a higher release rate of doxorubicin *in vitro*. Based on the calculated $K_{Blood/Plasma}$ values, the total amount of doxorubicin bound to red blood cells after 5 minutes of incubation was ~ 33% for both nanoparticulate formulations and free doxorubicin (control) over the entire concentration range. The equilibrium degree of binding (after 15 minutes of incubation) was 58-63% for free doxorubicin, 57-58% for Dox-PLGA/6.4 and 46-49% PLGA/7.4. The Dox-PLGA/6.4(G-25) NPs had the lowest equilibrium degree of binding to red blood cells (~ 34%).

Conclusion. Binding of the nanoparticle-bound doxorubicin (Dox-PLGA) to human red blood cells evaluated *in vitro* in the concentration range of 10-100 µg/ml is lower as compared with free doxorubicin. The NPs with a higher encapsulation efficiency and loading of doxorubicin exhibit lower distribution coefficients of doxorubicin between red blood cells and blood plasma ($K_{Blood/Plasma}$ and $K_{RBC/Plasma}$).

Key words: nanoparticles, PLGA, doxorubicin, encapsulation efficiency, binding to red blood cells.

For citation: Kovshova T.S., Osipova N.S., Belov A.V., Maksimenko O.O., Balabanyan V.Yu., Gelperina S.E. Effect of the parameters regulation of the nanoparticulate form of doxorubicin based on PLGA on the distribution between human blood plasma and red blood cells. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(8):11-18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-08-02>