

УДК 576.3.3144; 616.36002; 615.2.244

©Коллектив авторов

## ИЗМЕНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА В КРОВИ И ПЛАЗМЕ ПРИ ЕГО ВКЛЮЧЕНИИ В СОСТАВ ФОСФОЛИПИДНОЙ НАНОКОМПОЗИЦИИ

*М.А. Зыкова, О.М. Ипатова, В.Н. Прозоровский, Н.В. Медведева,  
А.А. Воскресенская, Т.С. Захарова, Т.И. Торховская\**

Учреждение Российской Академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН,  
Погодинская ул., д. 10, 119121, Москва; (495) 246-43-56; эл. почта: torti@mail.ru

С использованием оригинальной технологии, разработанной в ИБМХ РАМН, была получена композиция на основе растительных фосфолипидов и противоопухолевой лекарственной субстанции доксорубицин с размером частиц менее 30 нм. В экспериментах *in vitro* показано, что включение доксорубицина в фосфолипидные наночастицы снижает его связывание с клетками крови, повышая соответственно долю потенциально активного лекарства в плазме. При этом наблюдается сдвиг в распределении лекарства от белковой фракции к липопротеинам высокой плотности. Обсуждается значение наблюдаемых изменений для биодоступности и противоопухолевой активности доксорубицина.

**Ключевые слова:** доксорубицин, фосфолипидные наночастицы, липопротеины, эритроциты.

**ВВЕДЕНИЕ.** Доксорубицин – антибиотик атрациклинового ряда – широко применяемый в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний в виде растворов для внутривенного введения. Его действие обусловлено связыванием с ДНК клеток, что приводит к подавлению их роста и пролиферации [1]. Из-за большого объема распределения применение этого препарата сопровождается серьезными побочными проявлениями и высокой токсичностью по отношению к здоровым тканям. Высокая противоопухолевая активность побуждает продолжать работы в направлении создания новых лекарственных форм доксорубицина. Одним из направлений в конструировании лекарственных форм, применение которых снижает риски побочных проявлений, является снабжение лекарственных субстанций системами транспорта. Первыми из систем транспорта лекарства в организме были липосомы. Имеющиеся на фармацевтическом рынке липосомальные формы доксорубицина обладают определенными недостатками. Так, препарат Миоцет (TLC D-99) в форме липосом с размером частиц 150-180 нм быстро поглощается из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы [2], а стабилизированная полиэтиленгликолем (ПЭГ) форма доксорубицина (доксил, келикс) может вызывать дополнительные побочные действия из-за присутствия ПЭГ [3]. Поэтому в мире продолжают разработки новых, в том числе липидных, форм доксорубицина с повышенной специфичностью и эффективностью по отношению к клеткам опухоли.

---

\* - адресат для переписки

Ранее мы наблюдали повышение противоопухолевой активности доксорубина при его включении в фосфолипидные наночастицы размером 50-60 нм, стабилизированные глицерризиновой кислотой (на основе препарата "Фосфоглив") [4]. Далее нами была разработана транспортная фосфолипидная наносистема с размером частиц 20-30 нм и на её основе по оригинальной технологии получен ряд композиций с лекарствами разного спектра действия, в частности с доксорубином [5]. Размер наночастиц, осуществляющих транспорт лекарства в организме, считается существенным фактором обеспечения его биодоступности [2]. Это может быть связано как с повышением вероятности прохождения ультрамалых частиц через дефекты кровеносных сосудов в месте воспаления (опухоли) [6] или даже возможности эндцитоза [7], так и с взаимодействием с компонентами крови, влияющим на биораспределение лекарства в организме [8]. Поэтому можно было предположить потенциальную эффективность новой фосфолипидной наносистемы за счёт воздействия на ряд названных процессов.

Целью настоящей работы было изучение в экспериментах *in vitro* влияния транспортной наносистемы на основе растительных фосфолипидов на связывание доксорубина липопротеинами (ЛП) и клетками крови.

**МЕТОДИКА.** Для получения нанофосфолипидной (НФ) композиции использовали соевый фосфолипид фирмы "Липоид ГмбХ" (Германия) Lipoid S100 с содержанием фосфатидилхолина  $\geq 96\%$ , моногидрата мальтозы ("Merck", Германия), а также субстанцию - гидрохлорид доксорубина ("Dian Jiang, Chong Qing", Китай). Оригинальная технология получения фосфолипидной транспортной и лекарственной композиции с доксорубином подробно изложена в Заявке на изобретение [5]. Грубую эмульсию соевого фосфатидилхолина (25 мг/мл) в 10% растворе мальтозы, содержащую доксорубин гидрохлорид (2 мг/мл), пропускали под давлением 1000 атм. через гомогенизатор (Mini-Lab 7.3 VH, "Rannie", Дания), контролируя размер частиц с использованием лазерного корреляционного спектрометра N5 Submicron particle analyzer, "Beckman-Coulter Inc.", США). Размер частиц смешанной фосфолипидной эмульсии составлял не более 30 нм. Препарат пропускали через фильтр с размером пор 220 нм, разливали в стерильные флаконы по 10 мл и лиофилизировали с помощью лиофильной сушки Liolab F. Для экспериментов содержимое флакона растворяли дистиллированной водой до объёма 10 мл.

Степень связывания доксорубина с фосфолипидными частицами определяли, используя метод ультрафильтрации. 200 мкл исследуемого образца вносили в патрон для ультрафильтрации (Ultrafree-MC Filters NMWL 10000 Da), задерживающий частицы массой более 10000 Да, и центрифугировали 20 мин при 3000 g. Определяли концентрацию доксорубина в нижней камере патрона и в исходном препарате с помощью ВЭЖХ на приборе Agilent-1100, как описано ранее [4]. Процент включения лекарства вычисляли по разности концентрации в исходном образце и растворе, прошедшем через мембрану. Обнаружено, что 98% доксорубина включено в наночастицы фосфолипидной эмульсии. После растворения лиофилизированного порошка степень включения доксорубина и размер наночастиц сохранялись. Полученная композиция обладает определённой стабильностью, удерживая доксорубин при инкубации с плазмой до 4 часов [5].

В экспериментах *in vitro* использовали гепаринизированную кровь крыс-самцов линии Wistar весом около 300 г. Для выяснения распределения доксорубина между клетками крови и плазмой 900 мкл крови инкубировали с 100 мкл раствора НФ-доксорубина (2 мг/мл) при 37°C 30 минут. Плазму получали путём осаждения форменных элементов крови центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при 4°C. Доксорубин из плазмы и крови экстрагировали 9 объёмами метанола с 0,5% трифторуксусной кислотой (ТФУ). Количественно содержание доксорубина в экстрактах определяли с помощью ВЭЖХ. По разности полученных значений рассчитывали долю лекарства, связавшегося с форменными элементами крови.

Распределение доксорубина между компонентами плазмы оценивали после инкубации 3,8 мл плазмы с 0,2 мл раствора НФ-доксорубина (2 мг/мл) в течение 30 минут при 37°C. К инкубационной смеси добавляли NaBr (0,5 г/мл плазмы), переносили в центрифужные пробирки и наслаивали раствор NaBr с плотностью 1,019 г/мл. Центрифугировали 2 часа на ультрацентрифуге Optima L90K Beckman при 41000 об/мин в угловом роторе 65Ту при 4°C. Содержимое пробирок фракционировали, получая фракции липопротеинов очень низкой, низкой и высокой плотности (ЛОНП, ЛНП и ЛВП, соответственно) и донную белковую фракцию [9]. Содержание в них доксорубина определяли с использованием ВЭЖХ.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Представлялось целесообразным проследить за возможным перераспределением доксорубина в новой нанофосфолипидной форме между плазмой и клетками крови, так как имеются данные, что доксорубин при введении в кровь связывается с эритроцитами [10], взаимодействуя с гемоглобином [11]. Этот факт не учитывается многими исследователями при разработке лекарственных форм доксорубина, и внимание обращается в основном на общие фармакокинетические параметры. Вместе с тем ассоциация с клетками крови снижает долю активного лекарства в плазме, снижая эффективность терапевтического воздействия. Поэтому было проведено изучение влияния включения доксорубина в фосфолипидные наночастицы на его распределение в крови. В работе [12] полнота экстракции доксорубина из крови и тканей достигалась обработкой биологического материала водным раствором тритона X-100 и кислого изопропанола (0,75 М HCl). Нами разработан более простой метод экстракции доксорубина метанолом с 0,5% ТФУ, позволяющий экстрагировать не только лекарство, связанное с белками, но и связанное с нуклеиновыми кислотами. Как видно из таблицы, экстракция доксорубина из образца крови метанолом с 0,5% ТФУ в отличие от метанола позволяет полностью экстрагировать внесённое лекарство. Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют также о том, что ассоциация доксорубина с форменными элементами крови для свободного лекарства выше (содержание в плазме ниже), чем для его НФ-композиции: в плазме остается 48% против 57% введенного доксорубина, соответственно.

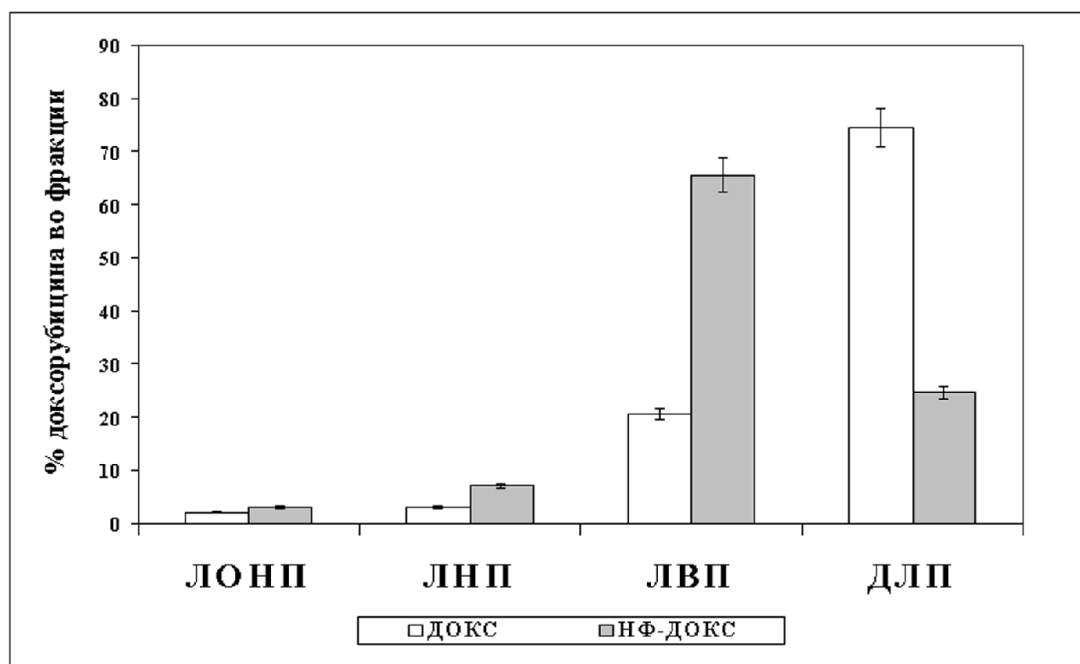
*Таблица.* Определение доксорубина в крови в зависимости от метода его экстракции. Содержание доксорубина в плазме после инкубации крови со свободным доксорубином и его НФ-композицией.

<b>Препарат</b>	<b>Метод экстракции/форма введенного лекарства</b>	<b>Определяемое количество доксорубина, мг/мл/% от введенного</b>
<b>Кровь + доксорубин, 200 мг/мл</b>	<b>Экстракция метанолом с 0,5% ТФУ</b>	<b>(200,8±3,1)/100%</b>
	<b>Экстракция метанолом</b>	<b>(140,6±2,0)/70,1%</b>
<b>Плазма после инкубации цельной крови с препаратом, содержащим доксорубин (200 мг/мл, экстракция метанолом с 0,5% ТФУ)</b>	<b>Доксорубин (субстанция)</b>	<b>(96±5)/48%</b>
	<b>НФ композиция доксорубина</b>	<b>(114±7)/57%</b>

## ДОКСОРУБИЦИН В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

Наряду с этим, оказалось, что при включении в фосфолипидную транспортную наносистему меняется также и распределение доксорубина в плазме – между отдельными фракциями липопротеинов и белковой (альбуминовой) фракцией.

На рисунке приведено распределение доксорубина между фракциями плазмы после ее инкубации со свободным лекарством и его НФ формой. Из рисунка видно, что при инкубации плазмы в присутствии свободного доксорубина большая часть лекарства (более 70%) обнаруживается в белковой фракции, что, вероятно, отражает его связывание с альбумином. Связывание лекарств с альбумином, как правило, обратимо и может оказывать двоякий эффект на его биодоступность к ткани-мишени: с одной стороны, оно создаёт депо свободного лекарства в плазме, а с другой - препятствует его эндоцитозу, и соотношение этих двух эффектов, зависящее от типа лекарства, для доксорубина, как и для большинства лекарств, не ясно [8]. Как видно из рисунка, для НФ-доксорубина доля лекарства в белковой фракции резко снижается (более чем в 3 раза), и, соответственно, увеличивается включение доксорубина во фракцию ЛВП. Небольшое, хотя и относительно выраженное (с 3% до 7%) повышение обнаружено и во фракции ЛНП. Хотя известно, что экспрессия ЛНП-рецепторов на клетках опухолей повышена [13], имеются данные и о транспорте в опухоль лекарств, связанных с ЛВП [14]. Кроме того, *in vivo* в плазме может происходить перераспределение как липидных компонентов ЛВП, так и ассоциированного лекарства, за счёт чего последнее может оказываться и в других фракциях [15], в частности повышать его долю в ЛНП. Это, в первую очередь, относится к липофильным лекарствам. Несмотря на пока лишь ограниченные данные о возможной ассоциации лекарств с ЛП плазмы и её влиянии на дальнейшую судьбу лекарства в организме, в Администрации по контролю пищевых и лекарственных веществ (FDA) в США изучение сродства к ЛП с 2002 года включено как неотъемлемая часть исследований при регистрации новых лекарств, содержащих липофильные компоненты [8].



**Рисунок.**

Распределение доксорубина в плазме крови между компонентами плазмы после её инкубации со свободным лекарством (Докс) и с НФ-доксорубином (НФ-Докс).  
ДЛП - делипидированная плазма, белковая фракция)

В связи с этим можно полагать, что наблюдаемое перераспределение доксорубина к ЛП при включении в транспортную фосфолипидную наноформу, вместе с повышением его общей доли в плазме, может способствовать его биодоступности и терапевтической эффективности – за счёт повышения условий, способствующих накоплению лекарства в ткани опухоли и возможного проникновения непосредственно в её клетки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hammer E., Bien S., Salazar M.G., Steil L., Scharf C., Hildebrandt P., Schroeder H.W., Kroemer H.K., Völker U., Ritter C.A. (2010) *Proteomics*, **10**, 99-114.
2. Cowens J.W., Creaven P.J., Greco W.R., Brenner D.E., Tung Y., Ostro M., Pilkiewicz F., Ginsberg R., Petrelli N. (1993) *Cancer Res.*, **53**, 2796-2802.
3. Pérez-López M.E., Curiel T., Gómez J.G., Jorge M. (2007) *Anticancer Drugs*, **18**, 611-617.
4. Ипатова О.М., Зыкова М.Г., Торховская Т.И. Медведева Н.В., Прозоровский В.Н. (2009) *Биомед. химия*, **55**, 185-194.
5. Арчаков А.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Зыкова М.Г., Воскресенская А.А. (2009) Фармацевтическая композиция на основе доксорубина и фосфолипидных наночастиц для лечения онкологических заболеваний. Заявка на изобретение №2009131864/044633 от 25.08.2009.
6. Gabano E., Ravera M., Osella D. (2009) *Curr. Med. Chem.*, **16**, 4544-4580.
7. Vijayanthimala V., Tzeng Y.K., Chang H.C., Li C.L. (2009) *Nanotechnology*, **20**, 425103.
8. Wasan K.M., Brocks D.R., Lee S.D., Sachs-Barrable K., Thornton S.J. (2008) *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 84-99
9. Тёптов В.В. (1999) *Ангиол. и сосуд. хирургия*, **5** (прил.), 218-239.
10. Marczak A., Kowalczyk A., Wrzesień-Kus A., Robak T., Józwiak Z. (2006) *Cell Biol. Int.*, **30**, 127-132.
11. Khan S.N., Khan A.U. (2008) *Bioinformation*, **2**, 401-404.
12. Laginha K.M., Verwoert S., Charrois G.J., Allen T.M. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**(19, pt 1), 6944-6949.
13. Menrad A., Anderer F.A. (1991) *Anticancer Res.*, **11**(1), 385-390.
14. McConathy W.J., Nair M.P., Paranjape S., Mooberry L., Lacko A.G. (2008) *Anticancer Drugs*, **19**, 183-188.
15. Kwong M., Wasan K.M. (2002) *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 1669-1675.

Поступила: 11. 03. 2010.

CHANGES OF DOXORUBICIN DISTRIBUTION IN BLOOD AND PLASMA  
AFTER ITS INCLUSION INTO NANOPHOSPHOLIPD FORMULATION

*M.G. Zykova, O.M. Ipatova, V.N. Prozorovskiy, N.V. Medvedeva, A.A. Voskresenskaya,  
T.S. Zakharova, T.I. Torkhovskaya*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pogodinskaya Street, Moscow,  
119121 Russia; tel.: +7(495)246-43-56; e-mail: torti@mail.ru

The drug composition based on the plant phospholipids and the antitumor drug doxorubicin (particle size <30 nm) was obtained using original technology elaborated in the Institute of Biomedical Chemistry (Russian Academy of Medical Sciences). In *in vitro* experiments demonstrated decreased drug association with blood cells for this nanophospholipid form as compared with free doxorubicin. This was accompanied by a with corresponding increase in its plasma level and also by drug redistribution from plasma protein fraction to high density lipoproteins. Significance of these changes for doxorubicin biodistribution and antitumor activity is discussed.

**Key words:** doxorubicin, phospholipids nanoparticles, lipoproteins, erythrocytes, antitumor activity.