

УДК 612.111+615.14

Эритроциты — носители лекарственных препаратов

**В. И. Сарбаш, А. Г. Тихонова, Т. А. Вуймо, А. Л. Дербов, Ю. Г. Александрович,
А. А. Бутылин, В. М. Витвицкий, Ф. И. Атауллаханов**

ВАСИЛИЙ ИВАНОВИЧ САРБАШ — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови Гематологического научного центра РАМН (ГНЦ РАМН). Область научных интересов: биохимия, биофизика.

АНАСТАСИЯ ГЕННАДЬЕВНА ТИХОНОВА — аспирантка, сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН. Область научных интересов: биохимия.

ТАТЬЯНА АЛЕКСЕЕВНА ВУЙМО — научный сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН. Область научных интересов: биотехнология, биохимия.

АЛЕКСАНДР ЛЕОНАРДОВИЧ ДЕРБОВ — сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН. Область научных интересов: физика, биофизика.

ЮЛИЯ ГЕННАДЬЕВНА АЛЕКСАНДРОВИЧ — аспирантка Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биотехнология.

АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ БУТЫЛИН — кандидат физико-математических наук, доцент кафедры медицинской физики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биохимия, биофизика, медицинская физика.

ВИКТОР МАРЬЯНОВИЧ ВИТВИЦКИЙ — кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН. Область научных интересов: биохимия, биофизика.

ФАЗОИЛ ИНОЯТОВИЧ АТАУЛЛАХАНОВ — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН, директор Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН. Область научных интересов: биохимия, биофизика, пространственная динамика биологических систем.

125167 Москва, Новозыковский пр., д. 4а, ГУ ГНЦ РАМН, тел. (495)612-55-31, E-mail fazly@hc.comcor.ru

Введение

Одной из важнейших проблем современной фармакологии является создание новых лекарственных форм существующих препаратов, позволяющих пролонгировать действие препаратов в десятки и сотни раз. Специальные формы традиционных препаратов могут обеспечивать эффективную направленную доставку лекарства в данный орган или клетки или его избирательное накопление.

Для создания новых лекарственных форм используются самые разнообразные подходы — от химической модификации препарата до заключения его в капсулы и оболочки. Среди возможных контейнеров для фармацевтических препаратов особое место занимают естественные контейнеры — клетки организма человека, в которые при определенных условиях может быть введена большая доза препарата без заметного ущерба для жизни клетки. Для этих целей наиболее широко применяют эритроциты. Процедуры введения в эритроциты или присоединения к ним различных

веществ достаточно просты и эффективны [1, 2]. Несомненными достоинствами эритроцитов являются также их идеальная биосовместимость и способность к длительной циркуляции в организме (порядка 100 дней). Весьма существенно и то, что разрушение эритроцитов в организме — это естественный процесс и он не приводит к каким-либо побочным эффектам. А использование в качестве переносчиков аутологичных эритроцитов сводит к минимуму риск инфицирования пациента. Относительно несложные методы обработки позволяют получать эритроциты-носители, которые селективно захватываются органами ретикулоэндотелиальной системы [3—6], а также клетками иммунной системы [7—9].

Одним из наиболее перспективных применений эритроцитов-переносчиков может быть доставка ферментных препаратов, метаболизирующих субстраты, проникающие через клеточную мембрану. Такой способ терапии может применяться для коррекции ферментопатий [10], для удаления из крови токсичных соединений [11], в химиотерапии онкологических

заболеваний [12, 13] и т.п. Большой интерес вызывает возможность использования эритроцитов в качестве биореакторов, способных переводить включенные в них предшественники лекарственных препаратов в активные формы [14, 15]. Описано введение в эритроциты целого ряда противоопухолевых препаратов или их предшественников, таких как метотрексат [16, 17], L-аспарагиназа [12, 13], карбоплатин [18], флударабин фосфат [14] и др. Значительное количество работ посвящено исследованию эритроцитов в качестве переносчиков антрациклиновых антибиотиков. Такие методы используются как в трансфузионной медицине, так и в производствах, связанных с выпуском различных компонентов крови.

Ниже обсуждаются основные методы загрузки химических веществ, лекарственных препаратов, белков и других компонентов в эритроциты. Многие из этих методов детально описаны [19], так что мы ограничимся лишь некоторыми их характеристиками.

Представлен также относительно новый метод, разработанный группой Маньяни (Institute of Biological Chemistry G. Fornaini, University of Urbino, Италия), позволяющий инкапсулировать лекарственные препараты в эритроциты человека для их практического использования в клинике в сравнительно небольших объемах (от 50 мл модифицированной аутологичной крови) и его оптимизированный вариант, разработанный нами в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН.

Основные методы загрузки лекарственных препаратов в эритроциты

Большинство методов включения веществ в эритроциты основывается на способности этих клеток обратимо деформировать свою поверхность без изменения ее площади, увеличивая при этом объем вплоть до образования в клеточной мембране микроразрывов с размерами, позволяющими макромолекулам проникнуть внутрь эритроцита.

К основным методам, реализующим это свойство клеточной (плазматической) мембраны эритроцита, относятся:

- 1) электропорация;
- 2) фармакологически вызванный эндоцитоз;
- 3) осмотический метод;
- 4) гипотонический гемолиз.

Электропорация

Этот метод загрузки лекарственных препаратов внутрь клетки [20] заключается в том, что клетки, помещенные в изотонический раствор, подвергаются импульсному (длительность импульса несколько микросекунд) воздействию электрического поля высокой напряженности (несколько киловольт). При превышении напряженности поля определенного порога в липидном бислое мембраны, представляющем собой диэлектрик, возникают множественные электрические пробои, проявляющиеся во временном образовании в мембране небольших пор. Это приводит к увеличению проницаемости клеточной мембраны [21–25]. В результате вещество, находящееся во внешнем растворе, в момент пробоя начнет диффундировать внутрь клетки, которая в естественном состоянии была непроницаема для данного вещества.

Стадия увеличения проницаемости клеток, подверженных электропорации, может длиться при температуре 0 °С до 30–60 мин. Этого времени, как правило, достаточно для достижения равновесного состояния концентраций лекарственного препарата вне и внутри клетки. Если после этого воздействия клетки проинкубировать в среде при температуре 37 °С в течение от нескольких минут до 1 ч, то поры, возникшие в результате пробоя, «затягиваются» и проницаемость мембраны возвращается к норме. Таким образом, лекарственный препарат оказывается «запечатанным» внутри клетки. Количество лекарственного препарата, оставшегося во внешнем растворе, можно удалить путем многократного отмывания клеток соответствующей средой.

Процедура электропорации сводится к следующему. Из исходной донорской крови по стандартной процедуре [21] готовят суспензию эритроцитов, которые затем инкубируют в среде, включающей изотонические растворы NaCl и сахарозы. Варьируя ионную проводимость среды путем смешения в разных количествах этих двух изотонических растворов и изменяя таким образом ее ионную силу, можно добиться при электрических пробоях образования в мембранах пор различных размеров [21–23].

Суспензию эритроцитов с гематокритом 10–20% (доля объема клеточной фракции (в %) относительно всего объема суспензии) смешивают с лекарственным препаратом, который требуется «запечатать» в клетку, и подвергают воздействию одиночного электрического импульса. Операцию проводят при температуре 25 °С. После охлаждения суспензии до 4 °С и инкубации осуществляют спонтанное закрытие пор в осмотически сбалансированной среде при 37 °С [22, 23]. В результате такой обработки эритроциты становятся практически неотличимы от контрольных как по форме и объему, так и по активности трансмембранного транспорта и жизнеспособности.

Установлено, что в человеческих эритроцитах в процессе пробоя мембраны разрушается Na⁺, K⁺-АТФаза [25]. При нарушении активного транспорта ионов мембраны эритроцитов становятся хорошо проницаемыми для ионов Na⁺ и K⁺. Калий начинает выходить из клеток наружу, а натрий поступает внутрь. Вслед за натрием в клетку поступает и вода. Клетки набухают и, как принято говорить, сферулируются — принимают форму сферы. Следствием этого процесса является разрушение клеток — лизис [21, 24].

Этот деструктивный процесс связан еще и с тем, что коллоидно-осмотическое давление гемоглобина внутри эритроцита, достигающее 30 мОсм, вынуждает воду из внешнего раствора устремляться внутрь клетки. На первой стадии это приводит к набуханию клетки, а когда ее объем достигнет 155% относительно исходного объема, целостность мембраны нарушается. Таким образом, конечным результатом электрического воздействия является осмотический лизис клеток. Но процессом такого лизиса можно управлять, искусственно меняя осмотическое давление среды.

Подход с защитой клетки от разрушения представлен на рис. 1. Для предотвращения осмотического набухания эритроцитов, вызываемого электрическим пробоем, в суспензию клеток вводят стахиозу (тетрасахарид) или белки, такие, например, как бычий сы-

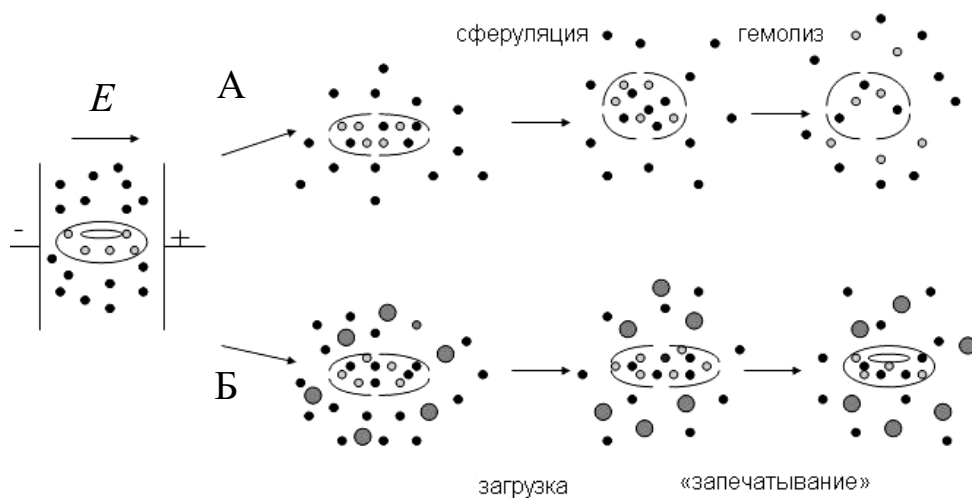


Рис. 1. Стадии процесса электропорации вещества в эритроциты:

А — в отсутствие макромолекул, нейтрализующих осмотическое давление гемоглобина, исход — гемолиз клетки; Б — с использованием макромолекул для нейтрализации коллоидно-осмотического давления гемоглобина, результат — «запечатывание» эритроцитов. Черные кружки — молекулы вещества, подлежащего включению в эритроциты; малые светлые кружки — гемоглобин, большие серые кружки — макромолекулы, снижающие осмотическое давление гемоглобина. E — электрическое поле, приложенное к суспензии клеток

вороточный альбумин. При выравнивании осмотического давления вне и снаружи клеток поры в их мембранах могут оставаться открытыми при 4 °С даже в течение нескольких дней.

Эндоцитоз

Эндоцитоз — это способность большинства типов клеток усваивать небольшие количества внеклеточной среды. В процессе эндоцитоза плазматическая мембрана клетки сначала втягивается внутрь, образуя некое подобие мешочка (рис. 2А, Б). Затем его горловина начинает стягиваться (рис. 2В), в результате чего поверхности мембраны на краю горловины сливаются, образуя внутри протоплазмы небольшую изолированную полость (рис. 2Г). Далее эта полость отъединяется от внутренней поверхности клеточной мембраны и, свободно перемещаясь внутри клетки, превращается в автономную внутриклеточную везикулу, находящуюся внутри цитоплазмы (рис. 2Д).

Таким образом, внешняя среда, включающая в себя белки, ионы и другие растворенные в ней вещества, оказывается захваченной клеткой.

Как и большинство типов ядерных клеток, ядерные предшественники эритроцитов также проявляют эндоцитозную активность. Например, эритробласты активно инкорпорируют белок ферритин, связанный с клеточной поверхностью. Ферритинсодержащие везикулы обнаруживаются даже на разных стадиях созревания эритроцита. Вероятно, что и на этих стадиях эритроциты также сохраняют некоторую эндоцитозную активность [26]. Зрелые же эритроциты, как правило, не активны к эндоцитозу, так как их мембрана теряет способность к слиянию. В то же время мембранное слияние у эритроцитов можно легко осуществ-

вить, если близкие участки клеточной мембраны искусственно привести в контакт.

Такой фармакологически стимулированный эндоцитоз был открыт Гинном с соавт. [27]. В настоящее время известно, что этот феномен могут вызывать несколько классов лекарств, среди которых наиболее изучены такие препараты, как прирахин и родственные ему 8-аминохинолины [28], винбластин [13], хлорпромазин [29] и другие катионные фенотиазины, гидрокортизон [28], пропанол [30], тетракаин и витамин А [31].

После обработки эритроцитов мембранотропными лекарствами начинается формирование эндоцитарной вакуоли. При этом вещества, растворенные как во внеклеточной жидкости, так и связанные с плазматической мембраной

клетки, могут оказаться внутри эндоцитарной везикулы [28]. Оптимальная температура, при которой происходит образование таких вакуолей, около 37 °С, оптимальная величина рН 7,9–8.

На основе фармакологически индуцированного эндоцитоза разработаны методы, позволяющие включать в цитоплазму даже такие огромные молекулы, как ДНК [32]. Поскольку эритроциты способны легко

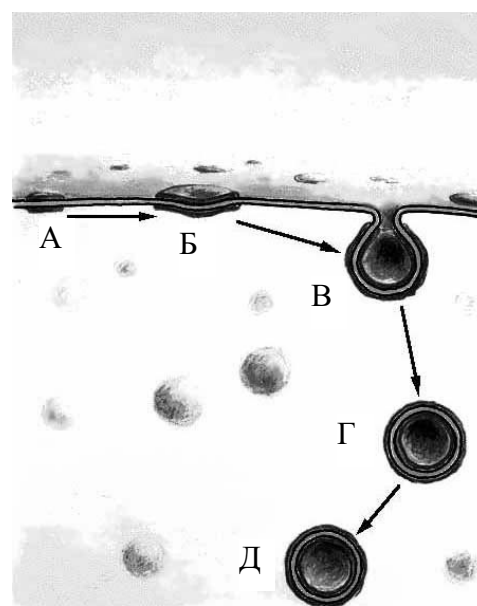


Рис. 2. Основные стадии метода эндоцитоза:

А, Б — втягивание мембраны внутрь клетки; В — стягивание «горловины» полости; Г, Д — образование автономной внутриклеточной везикулы

объединяться *in vitro* со множеством других типов клеток, фармакологически индуцированный эндотоз эритроцитов может оказаться перспективным для направленного введения ДНК внутрь клетки.

Осмотический пульсовый метод гемолиза

В осмотическом пульсовым методе гемолиза клетки подвергаются короткому, но интенсивному осмотическому стрессу [33, 34]. Для создания временного трансмембранного осмотического градиента, позволяющего молекулам входить внутрь клетки, обычно используют диметилсульфоксид (ДМСО). Процедура включает следующие этапы: инкубацию суспензии эритроцитов в растворе ДМСО; изотоническое разбавление суспензии эритроцитов раствором вещества, которое требуется включить внутрь клетки; инкубацию суспензии после разбавления; возвращение клеток к исходному состоянию.

Этапы осмотического метода гемолиза изображены на рис. 3. Первый этап — инкубация эритроцитов в растворе ДМСО. Эта операция необходима для того, чтобы достичь высоких значений осмотического давления внутриклеточной и внеклеточной жидкости (~1500 мОсм при концентрации ДМСО 8%) [35]. На следующем, втором, этапе суспензия клеток быстро и равномерно смешивается с изотоническим раствором, содержащим вещество, которое необходимо «запечатать» внутрь клеток. В начальный момент при смешивании концентрация ДМСО во внеклеточной жидкости резко снижается, за счет чего в системе создается временный градиент концентрации ДМСО. Он сохраняется до тех пор, пока не установится осмотическое равновесие в результате диффузии ДМСО из цитоплазмы клеток. В первой фазе под действием градиента концентрации происходит нагнетание воды из внеклеточного раствора внутрь эритроцитов и клеточное набухание, что в свою очередь вызывает увеличение

проницаемости клеточной мембраны за счет временного образования в ней пор. Через эти поры на третьем этапе осуществляется переход вещества внутрь клеток и частичный выход из клеток ДМСО. При этом осмотическое давление внутри клеток падает, поры закрываются, вещество «запечатывается» внутри клеток. Этот механизм во многом обусловлен тем, что транспорт молекул ДМСО из клетки наружу идет медленнее, чем вход внеклеточной воды внутрь клетки. Когда же поток молекул ДМСО из клеток восстановит осмотический баланс, клетки возвращаются к своей исходной форме — это четвертый этап.

Осмотический метод в значительной степени был исследован в работах [33, 36, 37]. Авторы поставили перед собой задачу получить клетки с низким родством к O_2 для использования их в клинических исследованиях. Для этого нужно было включить в цитоплазму эритроцитов инозитолгексафосфат, который связывается с дезоксигемоглобином (конкурируя с 2,3-дифосфоглицератом). При этом заметно снижается сродство гемоглобина к кислороду, что в свою очередь приводит к высвобождению кислорода из эритроцитов даже при его высоком парциальном давлении. Инозитолфосфат можно ввести в цитоплазму методом непрерывного потока, позволяющим проводить загрузку клинически значимых объемов эритроцитов [33]. При этом стерильность суспензии эритроцитов не нарушается, так как она напрямую не контактирует с вводимым извне раствором. Он поступает в суспензию стерильным, проходя сквозь диализную мембрану.

Следует отметить, что гипотонический диализ непрерывным потоком наиболее подходит для обработки больших количеств крови, но эта процедура длительная (два дня), в то время как метод с использованием ДМСО можно выполнить в пределах одного дня и он пригоден для обработки небольших порций крови [38].

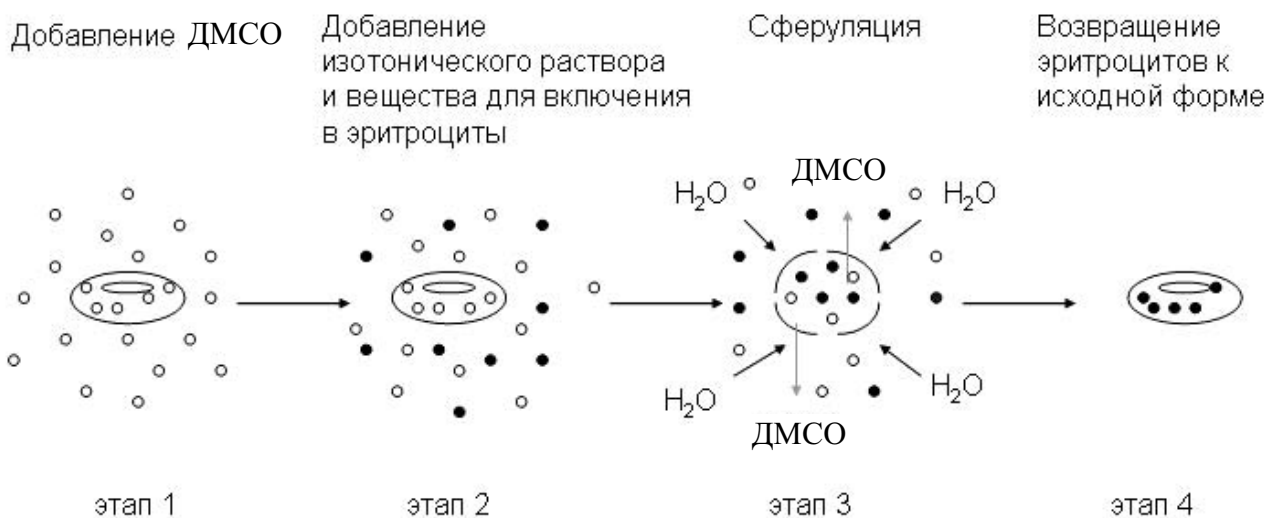


Рис. 3. Основные этапы метода осмотического гемолиза.

Черные кружки — молекулы вещества для включения в эритроциты, светлые кружки — молекулы ДМСО

Гипотонический гемолиз

Весьма высокий процент включения лекарственно-го вещества в эритроциты достигается, когда осуществляется гипотонический гемолиз клеток с последующим их «запечатыванием» (после введения вещества).

Существует несколько таких методов включения. Все они основываются на одних и тех же физико-химических свойствах эритроцитов. Эритроциты, помещенные в гипотонический раствор, меняют свою форму, превращаясь из нормального двояковогнутого дискоцита в сфероцит. Так как эритроциты не могут синтезировать плазматическую мембрану, площадь их поверхности всегда остается постоянной. Может меняться только их объем, причем увеличение объема может составлять 50–75% от нормы. При этом эритроцит принимает форму шара — превращается в сфероцит.

Если и далее снижать тоничность раствора путем разбавления суспензии дистиллированной водой (ниже 150 мОсм/кг), то мембрана эритроцита разрывается с образованием достаточно больших пор (200–500 Å), позволяющих клеточному содержимому обмениваться с внешней средой [43, 44]. В фазе гипотонического гемолиза внутриклеточные вещества переходят во внешнюю среду до выравнивания их концентраций внутри клетки и во внешнем растворе, а вещества, подлежащие включению в эритроциты, из внешней среды поступают внутрь эритроцитов.

В следующей фазе при повышении тоничности раствора до исходного уровня путем добавки соответствующего количества гипертонического раствора поврежденная мембрана эритроцитов восстанавливает свою целостность — клетка «запечатывается» и принимает свою нормальную двояковогнутую форму. Основные параметры плазматической мембраны также возвращаются к норме. Такие «запечатанные» эритроциты при циркуляции в кровотоке человека или животного имеют время жизни, близкое к норме.

Основные этапы метода включения вещества посредством гипотонического гемолиза показаны на рис. 4. Обычно исходные эритроциты получают из свежей крови, взятой у донора по стандартной методике. Можно использовать хранящуюся в стандартных условиях донорскую кровь.

Процедура загрузки вещества в эритроциты включает следующие стадии: разделение эритроцитов и плазмы; удаление лейкоцитов и тромбоцитов; несколько отмывок суспензии эритроцитов; гипотонический гемолиз; «запечатывание» и «реабилитация» клеток; дополнительные отмывки «запечатанных» эритроцитов; ресуспендирование клеток в плазме или фосфатном буферном растворе.

Для проведения гипотонического гемолиза отмытой эритроцитарной массы можно использовать следующие методы:

- метод разведения [39];
- метод ступенчатого гемолиза с предварительной сферуляцией клеток [40];
- диализный метод [41, 42];
- метод Маньяни;
- диализно-концентрационный метод.

Выбор того или иного метода включения зависит от характеристики вещества, которое необходимо ввести внутрь эритроцитов. Метод разбавления требует значительного расхода включаемого вещества, а метод ступенчатого гемолиза обеспечивает низкий процент включения вещества.

Диализный метод свободен от этих недостатков, но обладает и некоторыми особенностями, которые следует иметь в виду: требуется эритроцитарная масса с высоким уровнем гематокрита (70%), необходимо оптимизировать продолжительность диализа в зависимости от осмотического давления диализного буферного раствора, обязательно соблюдение точного значения осмотического давления эритроцитов (~120 мОсм) после этапа гемолиза, для того чтобы достигнуть хорошего включения вещества и высокого выхода жизнеспособных «запечатанных» клеток и др.

Не останавливаясь на конкретной процедуре исполнения отмеченных методов (они хорошо известны и описаны в литературе [8]), перейдем к методу Маньяни.

Этот метод был специально разработан для получения небольшого количества «запечатанных» эритроцитов (от 1 мл) [45, 46], которые использовали лишь в исследовательских целях. Метод Маньяни включает в себя три основных стадии: гипотонический гемолиз

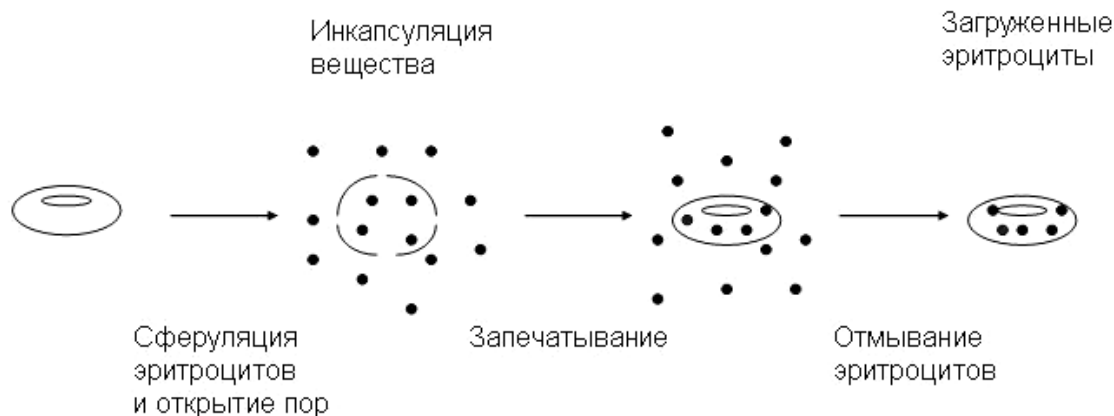


Рис. 4. Основные этапы метода гипотонического гемолиза.

Черные кружки — молекулы вещества, подлежащего включению в эритроциты

очищенных эритроцитов путем диализа суспензии клеток, содержащий фосфат натрия, гидрокарбонат натрия и глюкозу в течение 1 ч при 4 °С; изотоническое «запечатывание» клеток с «запечатывающим» раствором (аденин, инозин, пируват натрия, глюкоза, NaCl, pH = 7,4); восстановление функций эритроцитов путем инкубации суспензии в течение 30 мин при 37 °С. Выход «запечатанных» клеток достигает 78%.

В лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН метод Маньяни нашел свое развитие. В новом варианте он позволяет относительно быстро производить «запечатывание» лекарственных препаратов в эритроциты человека и получать количество модифицированной крови, достаточное для переливания крови и ее компонентов (до 400 мл).

Этот метод назван нами диализно-концентрационным. Используя все преимущества метода Маньяни, нам удалось избежать ряда присущих ему существенных недостатков. Главные из них — высокий расход препарата, предназначенного к «запечатыванию», а также заметное повреждение эритроцитов в ходе длительных и излишне травматичных для клеток процедур.

Диализно-концентрационный метод

Метод включает в себя пять основных этапов, это:

- 1) отмывка-сферулирование с получением суспензии сфероцитов;
- 2) прокачка суспензии сфероцитов через диализный патрон с одновременным ее концентрированием;
- 3) инкубация раскрытых клеток с «запечатываемым» веществом;
- 4) «запечатывание» нагруженных эритроцитов;
- 5) отмывка «запечатанных» эритроцитов.

В процесс вводится донорская кровь с исходным гематокритом 60—65%. Одноразовая отмывка эритроцитов производится с помощью проточной центрифуги на аппарате АТ1000 (Electromedics Inc, США) слабым гипотоническим раствором (180—200 мОсм), что приводит к их сферуляции. В отличие от метода Маньяни в данном случае сокращается часть процедур, исключается дополнительное центрифугирование суспензии эритроцитов в первом гипотоническом растворе, что предусматривается в методе Маньяни. Кроме того, такой подход снижает дополнительную гравитационную нагрузку на эритроциты при центрифугировании.

Обработка исходной эритроцитарной массы осуществляется при достаточно низкой скорости подачи гипотонического раствора (около 75 мл/мин) и скорости вращения центрифуги (4500 об/мин). В результате получается суспензия отмытых и одновременно сферулированных эритроцитов с гематокритом 50—60% в растворе осмолярностью 200—210 мОсм. Продолжительность этого этапа около 15 мин.

На следующем этапе суспензия сферулированных эритроцитов пропускается через диализный патрон, во внешнем контуре которого циркулирует охлажденный гипотонический раствор с осмолярностью около 90 мОсм. При гематокрите исходной эритроцитарной массы 60—65% на входе патрона возникает избыточное давление (50—100 мм рт.ст.). Вместе с тем достаточно высокая скорость прокачки диализного раствора (400 мл/мин) приводит к снижению гидростатическо-

го давления во внешнем контуре патрона. Создаваемый таким образом суммарный перепад давлений между внутренним и внешним контурами вызывает эффективный отток воды из суспензии во внешний объем, что приводит к концентрированию суспензии эритроцитов. Увеличение концентрации суспензии способствует резкому повышению эффективности процедуры заполнения эритроцитов веществом на следующем этапе — его инкубации с суспензией. Продолжительность диализа 15—20 мин. Осмотичность суспензии после прохождения через патрон не превышает 135 мОсм, что обеспечивает наиболее эффективное образование пор в мембране эритроцитов.

Суспензия «открытых» эритроцитов из патрона поступает в охлаждаемый до 4 °С резервуар, где происходит загрузка эритроцитов веществом, подлежащим включению в клетки.

Для «запечатывания» эритроцитов в суспензию вводится (при интенсивном перемешивании) концентрированный «запечатывающий» раствор, объем которого рассчитывается, исходя из осмотичности и объема суспензии. По окончании этой операции тоничность суспензии должна быть близка к 300 мОсм. Инкубация суспензии с веществом осуществляется в течение 30 мин при 37 °С.

Отмывка «запечатанных» эритроцитов производится в отмывочном блоке аппарата АТ1000 стандартным методом. Для этого используется около 2 л физиологического раствора. Скорость подачи раствора 150 мл/мин. Потери эритроцитов при отмывке составляют 25—30%. Выход «запечатанных» эритроцитов 30—45%.

Заключение

Описанные технологии введения лекарственных препаратов в эритроциты достаточно просты и позволяют легко вводить в эритроциты препараты различной природы с молекулярной массой, достигающей нескольких сотен тысяч дальтон. При этом в 50—200 мл эритроцитов может быть загружено несколько терапевтических доз препарата без ущерба для клеточности.

Исследования фармакокинетики эритроцитов, нагруженных белковыми и антрациклиновыми препаратами, показали, что время жизни таких эритроцитов-носителей после введения их в кровоток составляет 3—4 недели. Это срок, в десятки раз превышающий продолжительность циркуляции препаратов в кровотоке в случае, когда они вводятся в него напрямую. При этом концентрация препарата в плазме крови не имеет пиковых подъемов во время введения и поддерживается на терапевтическом уровне в течение 2—3 недель. Использование нагруженных эритроцитов резко снижает побочные эффекты изученных препаратов, в частности кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков.

Надо сказать, что широкое внедрение разработанных методов пока несколько тормозится отсутствием специальной аппаратуры для введения препаратов в эритроциты. В настоящее время в Гематологическом научном центре РАМН ведется разработка автоматизированной системы, осуществляющей все необходимые процедуры в едином закрытом цикле с использованием одноразовой пластиковой системы мешков и

трубок. Это позволяет стерильно и быстро получать необходимые количества клеток, несущих нужный препарат, прямо в клинике, у постели больного, используя его собственные эритроциты, что исключает вероятность заражения пациента инфекционными заболеваниями и резко упрощает технологию приготовления и применения эритроцитов-носителей.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, гранты № 06-04-08280, № 08-04-00077, № 07-04-00162.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ihler G.M.* Pharmac. Ther., 1983, v. 20, p. 151–169.
2. *Lewis D.A., Alpar H.O.* Int. J. Pharm., 1985, v. 22, p. 137–146.
3. *DeLoach J., Peters S., Pinkard O. e. a.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 496, p. 507–515.
4. *Zocchi E., Guida L., Benatti U. e. a.* Biotechnol. Appl. Biochem., 1987, v. 9, p. 423–434.
5. *Zocchi E., Tonetti M., Polvani C. e. a.* Ibid., 1988, v. 10, p. 555–562.
6. *Jordan J.A., De Loach J.R., Luque J. e. a.* Biochim. Biophys. Acta, v. 1996, 1291, p. 27–34.
7. *Magnani M., Rossi L., Brandi G. e. a.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, v. 89, p. 6477–6481.
8. *Magnani M., Casabianca A., Fraternali A. e. a.* Ibid., 1996, v. 93, p. 4403–4408.
9. *Chiarantini L., Droleskey R., Magnani M. e. a.* Biotechnol. Appl. Biochem., 1992, v. 15, p. 171–184.
10. *Bax B.E., Bain M.D., Fairbanks L.D. e. a.* Br. J. Haematol., 2000, v. 109, p. 549–554.
11. *Pei L., Petrikovics I., Way J.L.* Fundam. Appl. Toxicol., 1995, v. 28, p. 209–214.
12. *Ataullakhanov F.I., Vitvitsky V.M., Zhabotinsky A.M. e. a.* Biokhimiia, 1985, v. 50, p. 1733–1737.
13. *Kravtsov R., Colombat P.H., Desbois I. e. a.* Eur. J. Clin. Pharmacol., 1996, v. 51, p. 221–225.
14. *Fraternali A., Rossi L., Magnani M.* Biochim. Biophys. Acta, 1996, v. 1291, p. 149–154.
15. *Benatti U., Giovine M., Damonte G. e. a.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 1996, v. 220, p. 20–25.
16. *Pitt E., Johnson C.M., Lewis D.A.* Biochem. Pharmacol. 1983, v. 32, p. 3359–3368.
17. *De Loach J.R., Tangner C.H., Barton C.* Res. Exp. Med., 1983, v. 183, p. 167–175.
18. *Tonetti M., Gasparini A., Giovine M. e. a.* Biotechnol. Appl. Biochem., 1992, v. 15, p. 267–277.
19. *Colowick S.P., Kaplan N.O.* In: Methods in Enzymology. Eds. R. Green, K.J. Widder. Diego: Academic Press, 1987, p. 217–325.
20. *Tsong T.Y.* Ibid., p. 248–259.
21. *Kinosita K. Jr., Tsong T.T.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74(5), p. 1923–1927.
22. *Kinosita K. Jr., Tsong T.Y.* Nature (London), 1977, v. 268(5619), p. 438–441.
23. *Kinosita K. Jr., Tsong T.Y.* Ibid., 1978, v. 272(5650), p. 258–260.
24. *Kinosita K. Jr., Tsong T.Y.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 471(2), p. 227–242.
25. *Teissie J., Tsong T.Y.* J. Membr. Biol. 1980, v. 55(2), p. 133–140.
26. *Schekman R., Singer S.J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73(11), p. 4075–4079.
27. *Ginn F.L., Hochstein P., Trump F.P.* Science, 1969, v. 164(881), p. 843–845.
28. *Ben-Bassat I., Bensch K.G., Schrier S.L.* J. Clin. Invest., 1972, v. 51(7), p. 1833–1844.
29. *Schrier S.L., Junga I., Krueger J. e. a.* Blood. Cells, 1978, v. 4(1–2), p. 339–359.
30. *Greenwalt T.J., Lau F.O., Swierk E.M. e. a.* Br. J. Haematol., 1978, v. 39(4), p. 551–557.
31. *Murphy M.J. Jr.* Blood, 1973, v. 41(6), p. 893–899.
32. *Ihler M.G.* Bibl. Haematol., 1985, v. 51, p. 127–133.
33. *Franco R.S., Wagner K., Weiner M. e. a.* Am. J. Hematol., 1984, v. 17, p. 393–400.
34. *Franco R.S., Baker R., Novick S. e. a.* J. Cell. Physiol., 1986, v. 129, p. 221–229.
35. *Small W.C., Goldstein J.H.* Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 720(1), p. 81–86.
36. *Franco R.S., Weiner M., Wagner K. e. a.* Life Sciences, 1983, v. 32(34), p. 2763–2768.
37. *Franco R.S., Barker R., Mayfield G. e. a.* Transfusion, 1990, v. 30(3), p. 196–200.
38. *Mosca A., Paleari R., Russo V. e. a.* In: The use of resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors. Eds. M. Magnani, J.R. DeLoach. New York: Plenum Press, 1992, p. 19–26.
39. *Ihler G.M., Glew R., Schnure F.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, v. 70(9), p. 2663–2666.
40. *Rechsteiner M.* Exp. Cell Res., 1975, v. 93(2), p. 487–492.
41. *De Loach J., Ihler G.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 496(1), p. 136–145.
42. *Dale G.L., Villacorte D.G., Beutler E.* Biochem. Med., 1977, v. 18(2), p. 220–225.
43. *Baker R.F., Gillis N.R.* Blood, 1969, v. 33(2), p. 170–178.
44. *Baker R.F.* Nature (London), 1967, v. 215(99), p. 424–425.
45. *Magnani M., Rossi L., Bianchi M. e. a.* Biochim. Biophys. Acta, 1988, v. 972, p. 1–8.
46. *Magnani M., Rossi L., D'Ascenzo M., Panzani I., Bigi L., Zanella A.* Biotechnol. Appl. Biochem., 1998, v. 28 p. 1–6.