

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

5 (317)

**ҚЫРКҮЙЕК – ҚАЗАН 2016 ж.
СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ 2016 г.
SEPTEMBER – OCTOBER 2016**

1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі, м. ғ. д., проф.

Ж. А. Арзықұлов

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К. проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А. проф., академик (Қазақстан)
Акшулаков С.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Алшынбаев М.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бисенбаев А.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ботабекова Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Қайдарова Д.Р. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С. проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А. prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunefeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Қазақстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Қазақстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2016

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
академик НАН РК, д.м.н., проф.

Ж. А. Арзыкулов

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., чл.-корр. (Казахстан), зам. гл. ред.
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Кайдарова Д.Р. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов
Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,

www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

academician of NAS RK, doctor of medical science, professor

Zh. A. Arzykulov

Abzhanov Arkhat prof. (Boston, USA),
Abelev S.K. prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A. prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Botabekova T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh. prof., corr. member. (Kazakhstan), deputy editor in chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Kaydarova D.R. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S. prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A. prof. (Moscow, Russia)
Lunenfeld Bruno prof. (Israel)
Miyerbekov Ye.M. prof. (Kazakhstan)
Muminov T.A. prof., academician (Kazakhstan)
Purton Saul prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 317 (2016), 85 – 93

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

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

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

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

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

УДК 615.032

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

“National Laboratory Astana”, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В ПЕЧЕНЬ

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

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

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

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

Существующие на данный момент методы лечения HBV заключаются в применении иммуномодуляторов (ИМ) в комбинации с аналогами нуклеозидов (АН) [2-4]. ИМ, используемые для лечения HBV: интерферон альфа (ИФН- α), интерферон альфа 2b (ИФН α -2b), пегилированный ИФН α -2b и тимозин α 1 (Ta1). Целью ИМ-терапии является усиление регулируемого Т-лимфоцитами HBV/HCV специфического иммунного ответа, который помогает иммунной системе защитить человека от вирусной инфекции. АН направлены на подавление деятельности обратной транскриптазы/ДНК-полимеразы. Наиболее распространенным методом лечения пациентов с диагнозом HCV является применение пегилированного ИФН-2a в сочетании с рибавирином [5-8].

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

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

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

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

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

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

Инкапсуляция лекарственных препаратов в ЭФ диализным методом. Забранная цельная венозная кровь в пробирке с гепарином либо EDTA была откручена на центрифуге в течение 10 мин при 1900g, +4°C. Плазма и лейкоциты были аспирированы, а осажженные эритроциты были дважды промыты следующим образом. К эритроцитам был добавлен рабочий раствор Hepar (10 mM Hepar, 154 mM NaCl, 5 mM глюкоза, pH 7.4) так, чтобы итоговый объем составил 14 мл. Полученный раствор центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин, 4°C, а надосадок был удален. Во время центрифугирования образцы исследуемого препарата были приготовлены в необходимых концентрациях, и к диазиному буферу (15 mM NaHCO₃, 15 mM NaH₂PO₄, 20 mM глюкоза, 4 mM MgCl₂) были добавлены 2 mM АТФ - 0,121 г и 3 mM – 0,0092 г. Тем временем, диализные мешки в необходимом количестве были тщательно гидрированы в пробирках объемом 50 мл диализным буфером (без АТФ, без GSH). Следует отметить, что диализный мешок был всегда гидрирован, и в течение всей процедуры находился в одной и той же пробирке объемом 50 мл с диализным буфером без АТФ, без GSH. На одном конце мешка был завязан тугий узел, а непосредственно в сам мешок было внесено 900 мкл эритроцитов и 100 мкл исследуемого образца. Содержимое было сдавлено к завязанному концу диализного мешка, а на другом конце, оставив немного воздуха, было завязано 3 тугих узла. 50 мл диализного буфера с АТФ и GSH было перенесено в каждую из новых пробирок объемом 50 мл, количество новых пробирок определялось количеством исследуемых концентраций лекарственного вещества. Диализные мешки были помещены в каждую из пробирок. Диализ был проведен в ротаторе в течение 1 часа и при температуре 4 °C. После диализа полученные ЭФ были перенесены из диализных мешков в новые пробирки объемом 15 мл. Затем пробирки инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Для запаивания мембран ЭФ было

добавлено 100 мкл раствора PIGPA (5 mM аденозин, 100 mM инозин, 100 mM пируват натрия, 100 mM Na_3PO_4 , 100 mM глюкоза, 12% (m/w) NaCl) в каждую из пробирок. Содержимое было тщательно перемешано, после чего наблюдалось изменение цвета ЭФ, что свидетельствует об успешном восстановлении мембран. Пробирки инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Далее образцы были отцентрифугированы в течение 10 минут при 500g, 23°C, а супернатант был аккуратно удален. Вслед за этим ЭФ отмывали 2 раза. Для этого к ним был добавлен раствор Нерес (2 объема раствора на 1 объем полученных ЭФ) в каждую пробирку. Пробирки отцентрифугированы в течение 10 мин при 5500g, 23°C, а надосажок был аккуратно удален. Процедуру повторяли еще 1 раз. Полученные загруженные ЭФ хранили не более 24 ч при +4°C. Для оценки количества необратимо связанного лекарственного препарата ЭФ лизировали дистиллированной водой - к 1 объему ЭФ добавлялось 2 объема дистиллированной воды.

Иммуноферментный анализ. Содержание пегилированного ИФН α -2b в образцах эритроцитов измерялось с помощью набора (Abscam) для количественного определения пегилированных молекул в плазме, сыворотке и клеточных культурах, тканях.

Схема экспериментов *in vivo*. Для изучения динамики содержания пегилированного ИФН α -2b в крови и во внутренних органах были использованы белые беспородные лабораторные крысы самцы с массой тела 180-200 г. Животные были разделены на 2 группы: 1 группа получала пегилированный ИФН α -2b в концентрации 20 мкг/кг внутривенно, 2 группа получала тени эритроцитов, в которые был инкапсулирован пегилированный ИФН α -2b в концентрации 20 мкг/кг. Животных обеих групп выводили из эксперимента через 15 минут, 1 час, 3 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов. У всех животных были извлечены внутренние органы, и была взята кровь. Содержание пегилированного ИФН α -2b определяли с помощью коммерческого ИФА набора Abscam. Всего в эксперименте было использовано 80 животных. Извлеченные органы были подвергнуты гомогенизации и полученные образцы были заморожены при -80. В гомогенатах печени было изучено содержание Pegintron с помощью ИФА набора (Abscam).

Фармакокинетические исследования. Для математического моделирования фармакокинетических процессов использовали программу Borgia 1.03. Полученные данные, характеризующие уровень концентрации ИФН α -2b в сыворотке крови после однократного внутривенного введения свободного препарата и фармакоцитов, аппроксимировали в рамках однокамерной фармакокинетической модели.

Результаты исследований и их обсуждение. Было отработано три метода подготовки теней эритроцитов фармакоцитов (ЭФ) для инкапсуляции препарата: метод гипоосмического гемолиза, метод гипотонического пресвеллинга, диализный метод. Для получения ЭФ с ИФН α -2b использовали лиофилизированный порошок (Schering – Plough), содержащий 100 мкг активного вещества. В целях определения оптимальной концентрации препарата для его инкапсуляции в ЭФ, в эритроциты включали 3 различные концентрации ИФН α -2b: 10 мкг/мл, 50 мкг/мл и 200 мкг/мл. Было показано, что диализный метод, применявшийся для включения ИФН α -2b в тени эритроцитов, является щадящим методом, не нарушающим морфологию эритроцитов и их содержание в 1 мл раствора (рисунок 1).

Для изучения параметров включения ИФН α -2b определяли содержание ИФН α -2b с помощью иммуноферментного анализа в диализных водах и супернатанте (невключившийся препарат), смывных водах (обратно связанная фракция препарата) и в составе фармакоцитов (необратно связанная фракция препарата) (таблица 1).

Из полученных данных видно, что для ИФН α -2b характерна относительно высокая степень включения в тени эритроцитов (фармакоциты), при этом эффективность включения ИФН α -2b увеличивалась с использованием более низких концентраций препарата. В связи с чем следует заключить, что концентрация 10 мкг/мл являлась наиболее оптимальной для проведения дальнейших работ по оценке динамики содержания пегилированного ИФН α -2b в крови и внутренних органах лабораторных животных при внутривенном введении в виде фармакоцитарных эритроцитов.

Фармакокинетические кривые изменения концентрации ИФН α -2b в крови крыс после однократного внутривенного введения крысам свободного препарата представлены на рисунке 2. Поскольку кривая «концентрация – время» имеет вид монотонно снижающейся кривой, была

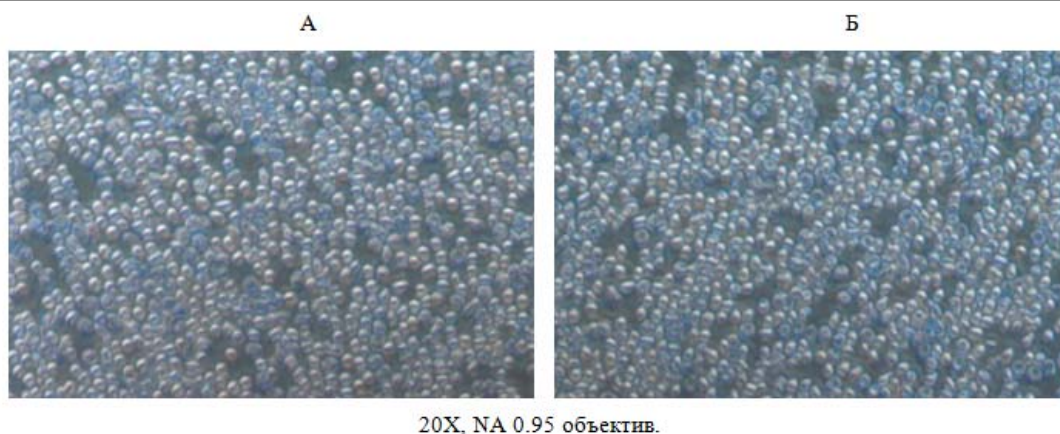


Рисунок 1 – Микрофотографии эритроцитов перед (А) и после включения пегилированного ИФН α -2b диализным методом (Б)

Таблица 1 – Анализ эффективности включения ИФН α -2b в тени эритроцитов

Параметры распределения	Содержание ИФН α -2b		
	200 мкг/мл	50 мкг/мл	10 мкг/мл
Степень связывания, %	31,9	57,4	77,6
Необратимая связь, %	60,2	67,1	96,5
Степень диссоциации, %	39,8	32,9	3,5
Содержание в тенях, %	19,2	38,6	74,9
Степень восстановления эритроцитов, %	57	27	82

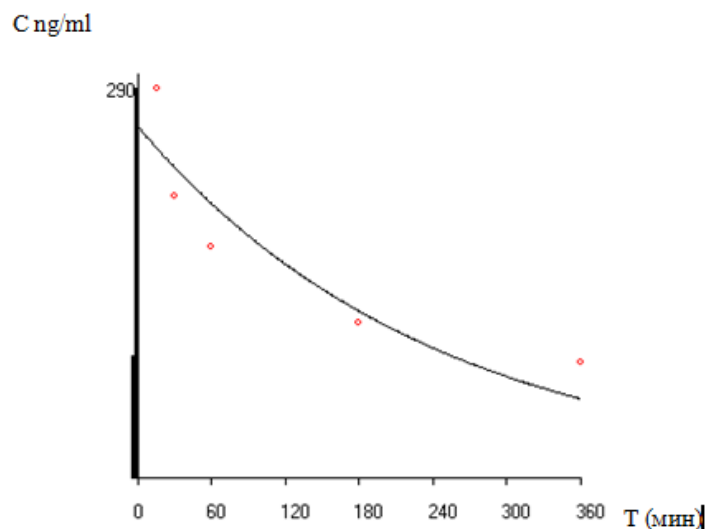


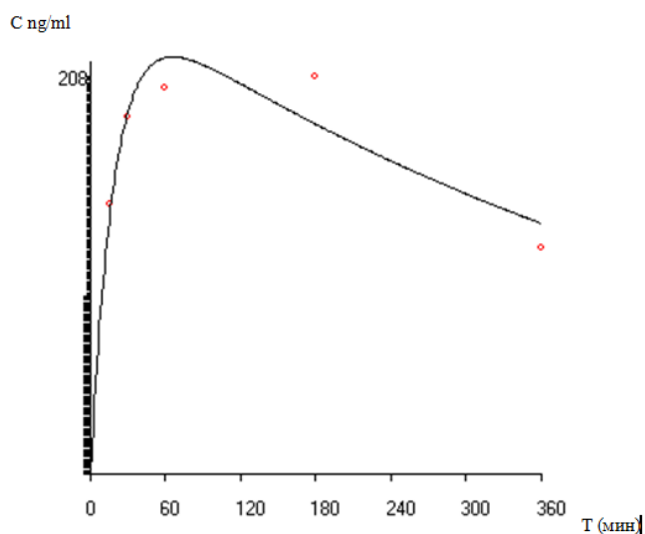
Рисунок 2 – Кривая «концентрация – время» в полулогарифмических координатах ИФН α -2b у крыс после однократного внутривенного введения свободного препарата в концентрации 10 000 μ g/ml массы тела

использована однокамерная фармакокинетическая модель без всасывания. Определён относительно длительный период полувыведения ($T_{1/2}$) – 167 минут, что связано с низким тотальным клиренсом (C_{cl}) (таблица 2). Низкий показатель кажущегося объёма распределения (V – 3,8 мл) свидетельствует о незначительном переходе исследуемой субстанции из центральной камеры в периферические и удерживании основной части препарата во внеклеточной жидкости. Ввиду двухфазности фармакокинетической кривой была использована однокамерная модель с ресорбцией.

Таблица 2 – Фармакокинетические параметры свободного и инкапсулированного в ЭФ ИФН α -2b после однократного внутривенного введения крысам

Параметр, размерность	Свободный ИФН α -2b	Инкапсулированный в ЭФ ИФН α -2b
Период полувсасывания, мин	–	13.096
$T_{1/2}$ Период полувыведения, min	167.270	373.988
Константа ресорбции	–	0.05292
K_{el} Константа выведения	0.00414	0.00185
V_{ss} Объем распределения, мл	3.82	14.6
CL_{tot} Клиренс, мл/мин	0.002	0.001
AUC 0- ∞ Интегральная площадь	63117.5	133047.8

Фармакокинетические кривые изменения концентрации ИФН α -2b в крови крыс после однократного внутривенного введения крысам инкапсулированного в ЭФ препарата представлены на рисунке 3. Было показано, что при внутривенном введении депонированного в эритроцитах ИФН α -2b, период полувыведения ($T_{1/2}$) и интегральная площадь под фармакокинетической кривой (AUC) по сравнению с фармакокинетикой свободного препарата возрастает вдвое, соответственно, снижается константа элиминации и клиренс (C_{el}), что однозначно предопределяет возможность более длительного сохранения препарата в крови и пролонгирования его эффекта (таблица 2). Увеличение показателя объема распределения (V) может свидетельствовать о повышении способности субстанции переходить из депо, созданного в крови, в периферические ткани.

Рисунок 3 – Кривая «концентрация – время» в полулогарифмических координатах ИФН α -2b у крыс после однократного внутривенного введения инкапсулированного в ЭФ препарата в концентрации 10 000 $\mu\text{g/ml}$ массы тела

Результаты исследования динамики содержания пегилированного ИФН 2b в печени показали, что при однократном внутривенном введении пегилированного ИФН α -2b форме фагоцитоза наблюдается статистически достоверное увеличение содержания ИФН α -2b в гомогенате ткани печени лабораторных животных по сравнению с контролем (свободный препарат) уже через 15 минут после введения, и данная динамика сохранялась на протяжении всего эксперимента (рисунок 4). При этом присутствие ИФН α -2b фиксировалось даже через 48 часов после введения препарата, в то время как в образцах печени животных, получавших инъекцию препарата в свободной форме, определить ИФН α -2b в образцах печени использованным методом ИФА оказалось невозможно.

Через 24 часа после однократного внутривенного введения свободного и депонированного в ЭФ ИФН α -2b некоторое количество препарата выявилось и в других периферических тканях.

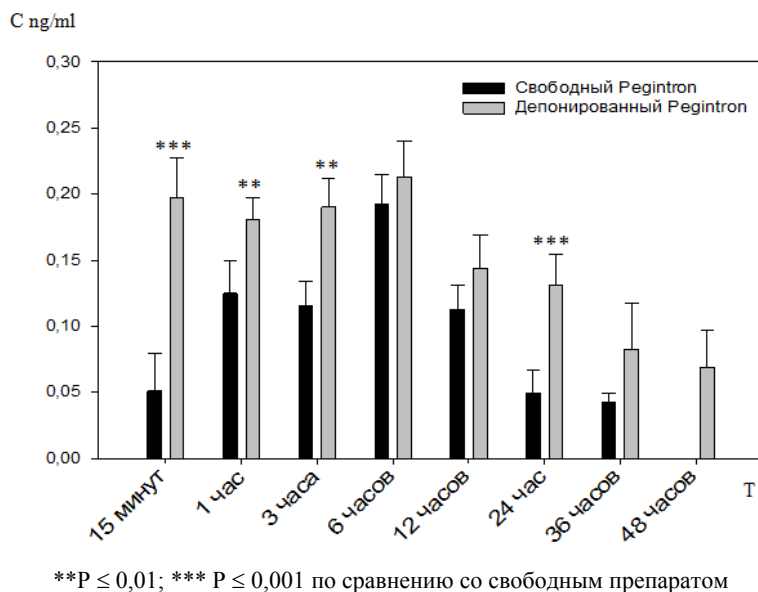


Рисунок 4 – Содержание ИФН α – 2b в печени лабораторных крыс (нг/мг общего белка)

Таблица 3 – Уровень концентрации ИФН α–2b в периферических тканях крыс через 24 часа после внутривенного введения (нг/мг общего белка)

Гомогенат ткани	Свободный препарат	Препарат, депонированный в эритроцитах
Печень	0,049 ± 0,017	0,13 ± 0,02***
Почки	0,15 ± 0,046	0,08 ± 0,01
Селезенка	0,025 ± 0,01	0,09 ± 0,02*
Сердце	0,018 ± 0,003	0,025 ± 0,004
Легкие	0,022 ± 0,006	0,06 ± 0,03
Подкожно-жировая клетчатка	0,023 ± 0,002	0,035 ± 0,004
*p < 0.05, *** p < 0.001.		

Результаты исследований представлены в таблице 3. Как видно из полученных данных, при введении свободного препарата наибольшая концентрация ИФН α–2b определяется в гомогенате тканей почек, что свидетельствует о завершающей стадии процесса элиминации. Далее, по убывающей распределение препарата идёт в ткани печени, селезёнки, подкожно-жировой клетчатки, легких и сердца. При введении ИФН α–2b в составе ЭФ, основным местом депонирования препарата в организме становится печень и селезёнка. Некоторое увеличение активности ИФН α–2b зафиксировано в легких, подкожно-жировой клетчатке и сердце статистически недостоверно.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что ЭФ обеспечивают задержку элиминации ИФН α–2b и вызывают его перераспределение в организме с максимальным накоплением в тканях печени и селезёнки – органах, содержащих наибольшее количество клеток ретикулоэндотелиальной системы. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что лизис ЭФ с противовирусными препаратами и иммуномодуляторами в РЭС позволяет обеспечить локальное высвобождение данных веществ в паренхиме печени.

Источник финансирования исследований. Работа выполнена в рамках Гранта 0114РК00491 по теме «Разработка методов целенаправленной доставки противовирусных препаратов и иммуномодуляторов для лечения вирусных гепатитов», финансируемой МОН РК.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, & Reddy KR (2005) Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 43(3):425-433.doi:10.1016/j.jhep.2005.04.009
- [2] Ayoub WS & Keeffe EB (2011) Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34(10):1145-1158.doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04869.x
- [3] Cuestas ML, Mathet VL, Oubina JR, & Sosnik A (2010) Drug delivery systems and liver targeting for the improved pharmacotherapy of the hepatitis B virus (HBV) infection. *Pharm Res* 27(7):1184-1202.doi:10.1007/s11095-010-0112-z
- [4] Lam YF, Yuen MF, Seto WK, & Lai CL (2011) Current Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B: Efficacy and Safety. *Curr Hepat Rep* 10(4):235-243.doi:10.1007/s11901-011-0109-z
- [5] Chamuleau RA (2007) Recent developments in the treatment of chronic hepatitis B and C. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde* 114(8):353-356.
- [6] Virovic L, Wu CH, Konishi M, & Wu GY (2005) Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 2(4):707-717.doi:10.1517/17425247.2.4.707
- [7] Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, & Izumi N (2013) Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 85(3):449-458.doi:10.1002/jmv.23497
- [8] Urquijo JJ, Diago M, Boadas J, Planas R, Sola R, Del Olmo JA, Crespo J, Erdozain JC, Anton MD, Arocena C, Suarez D, Gine J, Barrera JM, Gracia-Samaniego J, Perez R, Dalmau B, & Montoro M (2013) Safety and efficacy of treatment with pegylated interferon alpha-2a with ribavirin in chronic hepatitis C genotype 4. *Ann Hepatol* 12(1):30-35.
- [9] Di Stefano G, Colonna FP, Bongini A, Busi C, Mattioli A, & Fiume L (1997) Ribavirin conjugated with lactosaminated poly-L-lysine: selective delivery to the liver and increased antiviral activity in mice with viral hepatitis. *Biochem Pharmacol* 54(3):357-363.
- [10] Chimalakonda KC, Agarwal HK, Kumar A, Parang K, & Mehvar R (2007) Synthesis, analysis, in vitro characterization, and in vivo disposition of a lamivudine-dextran conjugate for selective antiviral delivery to the liver. *Bioconjug Chem* 18(6):2097-2108.doi:10.1021/bc700193d
- [11] Gutierrez Millan C, Zarzuelo Castaneda A, Gonzalez Lopez F, Sayalero Marinero ML, & Lanao JM (2008) Pharmacokinetics and biodistribution of amikacin encapsulated in carrier erythrocytes. *J Antimicrob Chemother* 61(2):375-381.doi:10.1093/jac/dkm477
- [12] Rajiv K, Saxena SK (2009) Aging and destruction of blood erythrocytes in mice. *CURRENT SCIENCE* 97(04):500-507.
- [13] Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F, & Kawada N (2007) Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 170(3):967-980.doi:10.2353/ajpath.2007.060441
- [14] Knutson M & Wessling-Resnick M (2003) Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38(1):61-88.doi:10.1080/713609210
- [15] Rechsteiner MC (1975) Uptake of proteins by red blood cells. *Experimental Cell Research* 93(2):487-492.doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(75)90478-4
- [16] Tajerzadeh H & Hamidi M (2000) Evaluation of hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in intact human erythrocytes. *Drug Dev Ind Pharm* 26(12):1247-1257.doi:10.1081/ddc-100102306
- [17] Hamidi M, Zarrin AH, Foroozesh M, Zarei N, & Mohammadi-Samani S (2007) Preparation and in vitro evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-alpha 2b. *Int J Pharm* 341(1-2):125-133.doi:10.1016/j.ijpharm.2007.04.001

REFERENCES

- [1] Ferenci P, Fried MW, Shiffman ML, Smith CI, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Chaneac M, & Reddy KR (2005) Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40 KD)/ribavirin. *J Hepatol* 43(3):425-433.doi:10.1016/j.jhep.2005.04.009
- [2] Ayoub WS & Keeffe EB (2011) Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 34(10):1145-1158.doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04869.x
- [3] Cuestas ML, Mathet VL, Oubina JR, & Sosnik A (2010) Drug delivery systems and liver targeting for the improved pharmacotherapy of the hepatitis B virus (HBV) infection. *Pharm Res* 27(7):1184-1202.doi:10.1007/s11095-010-0112-z
- [4] Lam YF, Yuen MF, Seto WK, & Lai CL (2011) Current Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B: Efficacy and Safety. *Curr Hepat Rep* 10(4):235-243.doi:10.1007/s11901-011-0109-z
- [5] Chamuleau RA (2007) Recent developments in the treatment of chronic hepatitis B and C. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde* 114(8):353-356.
- [6] Virovic L, Wu CH, Konishi M, & Wu GY (2005) Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 2(4):707-717.doi:10.1517/17425247.2.4.707
- [7] Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, & Izumi N (2013) Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 85(3):449-458.doi:10.1002/jmv.23497

- [8] Urquijo JJ, Diago M, Boadas J, Planas R, Sola R, Del Olmo JA, Crespo J, Erdozain JC, Anton MD, Arocena C, Suarez D, Gine J, Barrera JM, Gracia-Samaniego J, Perez R, Dalmau B, & Montoro M (2013) Safety and efficacy of treatment with pegylated interferon alpha-2a with ribavirin in chronic hepatitis C genotype 4. *Ann Hepatol* 12(1):30-35.
- [9] Di Stefano G, Colonna FP, Bongini A, Busi C, Mattioli A, & Fiume L (1997) Ribavirin conjugated with lactosaminated poly-L-lysine: selective delivery to the liver and increased antiviral activity in mice with viral hepatitis. *Biochem Pharmacol* 54(3):357-363.
- [10] Chimalakonda KC, Agarwal HK, Kumar A, Parang K, & Mehvar R (2007) Synthesis, analysis, in vitro characterization, and in vivo disposition of a lamivudine-dextran conjugate for selective antiviral delivery to the liver. *Bioconjug Chem* 18(6):2097-2108.doi:10.1021/bc700193d
- [11] Gutierrez Millan C, Zarzuelo Castaneda A, Gonzalez Lopez F, Sayalero Marinero ML, & Lanao JM (2008) Pharmacokinetics and biodistribution of amikacin encapsulated in carrier erythrocytes. *J Antimicrob Chemother* 61(2):375-381.doi:10.1093/jac/dkm477
- [12] Rajiv K, Saxena SK (2009) Aging and destruction of blood erythrocytes in mice. *CURRENT SCIENCE* 97(04):500-507.
- [13] Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F, & Kawada N (2007) Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 170(3):967-980.doi:10.2353/ajpath.2007.060441
- [14] Knutson M & Wessling-Resnick M (2003) Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38(1):61-88.doi:10.1080/713609210
- [15] Rechsteiner MC (1975) Uptake of proteins by red blood cells. *Experimental Cell Research* 93(2):487-492.doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(75)90478-4
- [16] Tajerzadeh H & Hamidi M (2000) Evaluation of hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in intact human erythrocytes. *Drug Dev Ind Pharm* 26(12):1247-1257.doi:10.1081/ddc-100102306
- [17] Hamidi M, Zarrin AH, Foroosh M, Zarei N, & Mohammadi-Samani S (2007) Preparation and in vitro evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-alpha 2b. *Int J Pharm* 341(1-2):125-133.doi:10.1016/j.ijpharm.2007.04.001

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

“National Laboratory Astana”, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан

ИММУНОРЕТТЕУШІ ПЕПТИДТЕРДІ БАУЫРҒА МАҚСАТТЫ БАҒЫТТАП ЖЕТКІЗУ МАҚСАТЫНДА ЭРИТРОЦИТТЕРДІҢ ҚАПШЫҒЫН ҚОЛДАНУ

Аннотация. Зерттеудің мақсаты – ИФН α -2b пегилірленген иммунореттегіш пептидін бауырға мақсаттап, бағыттап жеткізу мақсатында эритроциттердің қапшығын қолданудың мүмкіндігін зерттеу болып табылады. Зерттеу барысында инкапсуляциялаудың түрлі әдістері қолданылды:гипоосмотық гемолиз әдісі, гипотондық пресвеллинг әдісі және диализ әдісі қолданылды. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесіне сүйене отырып, дәрілік препаратты эритроцит қапшығына жүктеуде ең тиімді әдіс болып диализ әдісі таңдалып алынды. Осы әдіс негізінде төмен концентрацияда ИФН α -2b фармакоциттерге жүктелуі жақсы жүрді. Дәрілік препараттың фармакокинетикасын зерттеу мақсатында, бос формадағы және фармакоциттерге жүктелген ИФН α -2b зертханалық жануарларға инъекция жасалынып, белгілі уақыт өлшемімен жануарлардың ішкі ағзаларының гомогенаттары мен қан сарысуындағы препараттың концентрациясы өлшенді. Эритроциттердің қапшығына ИФН α -2b инкапсуляциялаудың төмендегідей артықшылықтары болатыны көрсетілді: инкапсуляциялау жолымен препараттың фармакокинетикасы жақсарды, препараттың клиренсі төмендеді, басқа ішкі ағзаларға таратылуы азайды. Алынған нәтижелер, иммунореттеуші пептидтермен толықтырылған эритроцит қапшықтарының бауырға дәрілік заттарды бағыттап жеткізуде тиімді жүйе гипотезасын растады.

Тірек сөздер: мақсатты бағыттап жеткізу, вирустық гепатит, эритроцит қапшықтары, пегилірленген интерферон α - 2b.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 14.10.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
11,75 п.л. Тираж 300. Заказ 5.