

ISSN 0507-3758

ВОПРОСЫ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

4 - 1999

TOM 45 VOL. 45

PROBLEMS IN ONCOLOGY

VOPROSY ONKOLOGII

А.А. Скороход, В.М. Витвицкий, Р.А. Кульман, Ф.И. Атауллаханов

ПОВРЕЖДАЮЩЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ РУБОМИЦИНА И ДОКСОРУБИЦИНА НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Рубомицин в диапазоне концентраций 0,2—5,0 мг/мл клеток и доксорубицин в диапазоне концентраций 0,2—1,0 мг/мл клеток в изотонической среде вызывают выход гемоглобина (Hb) и K^+ из эритроцитов, увеличение объема эритроцитов и ухудшение их деформируемости. Выход Hb и K^+ происходит с постоянной скоростью и пропорционально концентрации антибиотика в течение нескольких часов. Выход Hb существенно не изменяется в температурном интервале 4—21 °С (за исключением экспериментов при концентрации рубомицина 5,0 мг/мл клеток) и резко увеличивается при 37 °С. Скорость выхода Hb и K^+ из эритроцитов практически не отличается от контрольных значений при концентрации рубомицина или доксорубицина 0,2 мг/мл клеток. При концентрации антибиотика 1,0 мг/мл клеток и 37 °С скорость выхода Hb составляет 0,34—5,6%, а скорость выхода K^+ — 1,0—8,2% в час от максимально возможного выхода. При концентрации рубомицина 5,0 мг/мл клеток выход Hb достигает 10%, а выход K^+ — 17% в час от максимально возможного выхода. При концентрации рубомицина 5,0 мг/мл клеток в некоторых экспериментах выход Hb был значительно выше при 4 °С, чем при 21 °С. Деформируемость эритроцитов, определенная по их фильтруемости через мембранные фильтры с диаметром пор 3 мкм, при концентрациях антибиотиков, не превышающих 0,3 мг/мл клеток, остается близкой к контрольным значениям в течение нескольких часов. При концентрациях антибиотиков 1,0 мг/мл клеток и более деформируемость эритроцитов падает до нуля в течение 10 мин. Содержание АТФ в эритроцитах практически не отличается от контроля в процессе их инкубации с антибиотиком в течение нескольких часов.

Ключевые слова: рубомицин, доксорубицин, эритроциты, выход гемоглобина, выход K^+ , деформируемость, АТФ.

Антрациклиновые антибиотики рубомицин (даунорубицин) и доксорубицин широко используются для химиотерапии различных онкологических заболеваний [5, 7, 8]. Однако они, как и большинство противоопухолевых препара-

тов, обладают высокой токсичностью, что может приводить к серьезным побочным эффектам при их применении [5, 7, 8]. Одним из перспективных путей снижения токсичности лекарственных препаратов является использование переносчиков для их транспорта в организме. Снижение токсичности препарата при использовании переносчиков может достигаться за счет снижения концентрации препарата в крови при увеличении времени его циркуляции либо за счет преимущественной доставки препарата в пораженные органы или клетки. Показано, что при использовании эритроцитов в качестве переносчиков антрациклиновых антибиотиков (рубомицина и доксорубицина) может быть достигнуто как увеличение времени циркуляции препарата в организме [12, 16], так и преимущественная доставка его в селезенку и печень [18]. Использование нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов приводит к повышению противоопухолевой активности препаратов и снижению их токсичности [11, 14—16, 19]. Описаны первые результаты применения нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов в клинике [12, 16, 17].

Однако серьезной проблемой, возникающей при приготовлении и применении нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов является повреждающее воздействие этих антибиотиков на клетки. Антрациклиновые антибиотики вызывают значительный выход гемоглобина (Hb) из эритроцитов, а при больших концентрациях — разрушение клеток [2, 3, 10, 17]. Переливание таких эритроцитов может привести к нежелательным последствиям. В связи с этим возникает необходимость в изучении влияния антрациклиновых антибиотиков на эритроциты. В частности, в определении допустимых концентраций рубомицина и доксорубицина для введения в эритроциты, в выяснении условий хранения (допустимые времена и температуры) эритроцитов, нагруженных антрациклиновыми антибиотиками. Необходимо также иметь представление о способности нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов к циркуляции в организме. Способность эритроцитов проходить по ткане-

вым капиллярам определяется их деформируемостью, которая может быть определена путем фильтрации эритроцитов через мембранные фильтры с цилиндрическими порами диаметром 3 мкм [4, 6].

Материал и методика

В работе использовали рубомицина гидрохлорид и доксорубицина гидрохлорид производства объединения «Мосмедпрепараты» им. Л.С.Карпова, ныне — ФАО «Ферейн».

Эритроциты выделяли из консервированной эритроцитарной массы. Эритроцитарную массу центрифугировали 10 мин при 1000 г и удаляли плазму и верхний слой клеток. После этого эритроциты трижды отмывали путем ресуспендирования в 3-кратном объеме раствора PBS (NaCl — 140 мМ, Na₂HPO₄ — 9 мМ, NaH₂PO₄ — 1,3 мМ, глюкоза — 5 мМ, рН=7,4) с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 1000 г и удалением надосадка. Отмытые эритроциты ресуспендировались в PBS, содержащем антибиотик, до значения гематокрита 40—50%, и суспензия инкубировалась при постоянной температуре и перемешивании 8 ч. В качестве контроля использовалась при постоянной температуре и перемешивании в растворе PBS, не содержащем антибиотик. Для инкубации эритроцитов с доксорубицином рН инкубационного раствора снижался до 7,0, поскольку при больших значениях рН доксорубицин плохо растворим.

Для определения выхода гемоглобина и К⁺ из эритроцитов образцы суспензии центрифугировались 10 мин при 1000 г. Концентрацию гемоглобина в надосадке определяли по высоте пика оптической плотности в спектре гемоглобина при длине волны 415 нм. Общее содержание гемоглобина в суспензии определяли по высоте пика при 415 нм в спектре водного лизата суспензии. Относительный выход гемоглобина (в %) определяли как отношение высот пиков при 415 нм в спектрах надосадочного раствора и водного лизата. Концентрацию К⁺ в надосадках и в водных лизатах суспензии определяли на пламенном фотометре. Подсчет числа клеток в суспензии и определение их объема производили кондуктометрическим методом [9] с помощью прибора «Coulter—Counter» (Франция).

Деформируемость эритроцитов оценивали по их фильтруемости (способности проходить по капиллярам, путем измерения скорости протекания суспензии клеток через мембранные фильтры с цилиндрическими порами при давлении 60 мм вод. ст. с помощью прибора ИДА-01, представляющего собой модификацию гемореометра Хансса [6]. Перед измерением образцы инкубируемой суспензии разбавляли раствором PBS до значения гематокрита 1%. Для каждого фильтра определяли время протекания 250 мкл ресуспендирующего раствора (Т_б) и суспензии эритроцитов (Т_с). Для характеристики деформируемости эритроцитов использовали отношение этих времен (Т_б/Т_с). В работе использовали фильтры толщиной 9 мкм с диаметром пор 3 мкм. Измерения проводили при комнатной температуре (21 °С). Погрешность измерения Т_б/Т_с составляла около 10%. Концентрацию АТФ в эритроцитах определяли модифицированным люциферин-люциферазным методом [1].

Результаты

1. Влияние рубомицина и доксорубицина на кинетику выхода гемоглобина из эритроцитов. Влияние рубомицина на кинетику выхода гемоглобина из эритроцитов исследовали при концентрациях рубомицина 0,2—5,0 мг/мл клеток и при температурах 4—37 °С (табл. 1). Полученные результаты показали, что в присутствии рубомицина на протяжении 8 ч инкубации наблюдается монотонный выход гемоглобина из эритроцитов. При концентрации рубомицина 0,2 мг/мл клеток во всем исследованном диапазоне температур выход гемоглобина из эритроцитов за 8 ч инкубации составлял 1,6±0,6% от максимально возможного выхода, практически не отличаясь от выхода гемоглобина в контрольной суспензии. Выход гемоглобина существенно возрастал при увеличении концентрации антибиотика и при увеличении температуры до 37 °С. При концентрации рубомицина 5 мг/мл клеток и температуре 37 °С выход гемоглобина из эритроцитов достигал 10% в час от максимально возможного выхода. Интересно отметить, что при такой концентрации рубомицина в некоторых экспериментах аналогичный выход гемоглобина (до 10% в час) наблюдался также при 4 °С. При концентрациях рубомицина, не превышающих 1 мг/мл клеток, выход гемоглобина практически не зависел от температуры в диапазоне 4—21 °С (см. табл. 1). Влияние доксорубицина на кинетику выхода гемоглобина из эритроцитов исследовалось при концентрациях доксоруби-

Таблица 1
Влияние рубомицина и доксорубицина на скорость выхода гемоглобина из эритроцитов (% в час от максимально возможного выхода) при различных температурах

Температура, °С	Доксорубин (мг/мл клеток)										
	0	0,2	1,0	5,0	0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	1,0
4	0,09±0,03 (7)	0,15±0,05 (6)	0,55±0,04 (7)	4,1±3,3 (7)	0,1±0,04 (3)	—	0,08±0,0 (1)	0,36±0,0 (1)	0,42±0,0 (1)	0,33±0,0 (1)	0,4±0,2 (3)*
21	0,16±0,06 (5)	0,19±0,06 (4)	0,48±0,16 (5)	1,4±0,7 (5)	0,1±0,05 (6)	0,13±0,02 (3)	0,20±0,07 (2)	0,31±0,0 (1)	0,2±0,1 (4)	0,36±0,0 (1)	0,55±0,3 (5)
37	0,22±0,06 (8)	0,31±0,02 (5)	2,0±1,0 (7)	6,5±1,3 (8)	0,14±0,02 (5)	—	0,23±0,06 (2)	—	0,29±0,05 (4)	0,51±0,0 (1)	0,75±0,4 (5)

Примечание: в скобках указано количество экспериментов.

цина 0,2—1,0 мг/мл клеток и при температурах 40—37 °С. Исследования при концентрации доксорубицина более 1,0 мг/мл клеток были затруднены из-за агрегации эритроцитов, вызываемой антибиотиком. В присутствии доксорубицина на протяжении 8 ч инкубации также наблюдался монотонный выход гемоглобина из эритроцитов. При концентрации доксорубицина 0,2 мг/мл клеток во всем исследованном диапазоне температур выход гемоглобина из эритроцитов за 8 ч инкубации составлял $1,0 \pm 0,1\%$ от максимально возможного выхода, что практически не отличалось от выхода гемоглобина в контрольной суспензии. При концентрациях доксорубицина, не превышающих 0,5 мг/мл клеток, выход гемоглобина существенно не зависел от температуры в диапазоне 4—37 °С. При концентрации доксорубицина 0,6 и 1 мг/мл клеток выход гемоглобина возрастал при увеличении температуры до 37 °С (см. табл. 1).

2. Влияние рубомицина и доксорубицина на кинетику выхода K^+ из эритроцитов. Влияние рубомицина и доксорубицина на кинетику выхода K^+ из эритроцитов было исследовано на эритроцитах двух разных доноров при температуре 37 °С при концентрациях рубомицина 1,0 и 5,0 мг/мл клеток и доксорубицина 0,5 и 1,0 мг/мл клеток (табл. 2). На протяжении 6 ч инкубации наблюдался монотонный выход K^+ из эритроцитов. При концентрации рубомицина 5,0 мг/мл клеток выход K^+ из эритроцитов за 6 ч инкубации достигал 80 и 100% от максимально возможного выхода.

3. Влияние рубомицина на объем эритроцитов и число клеток в суспензии. В большинстве случаев в ходе инкубации эритроцитов с рубомицином и доксорубицином гематокрит суспензии оставался практически неизменным, несмотря на значительный выход гемоглобина из клеток в некоторых экспериментах. И только при выходе гемоглобина из эритроцитов, превышавшем 25—30%, при концентрации рубомицина 5 мг/мл клеток, наблюдалось снижение гематокрита суспензии. При этом граница между клетками и средой в гематокритном капилляре становилась нечеткой. Измерения, проведенные с помощью кондуктометрического

счетчика клеток, показали, что при инкубации эритроцитов с рубомицином их средний объем значительно увеличивался, а также расширялось распределение клеток по объемам (рис. 1). Средний объем эритроцитов увеличивался пропорционально концентрации рубомицина в течение первых 30—60 мин инкубации клеток с рубомицином и далее практически не менялся. Количество клеток в суспензии, определенное кондуктометрическим методом, не менялось в ходе инкубации эритроцитов с антибиотиком, однако не исключено, что выбранный метод не позволяет отличить нормальные эритроциты от теней. Время возрастания объема эритроцитов в присутствии рубомицина соответствует характерному времени связывания рубомицина эритроцитами [2, 3, 10].

4. Влияние рубомицина и доксорубицина на деформируемость эритроцитов. Влияние рубомицина на деформируемость эритроцитов было исследовано на эритроцитах 3 разных доноров в диапазоне концентраций 0,2—1,0 мг/мл клеток при комнатной температуре 21 °С (рис. 2). Зависимость деформируемости эритроцитов от времени инкубации резко изменялась в интервале концентраций рубомицина от 0,3 до 0,6 мг/мл клеток. При концентрациях 0,6 мг/мл клеток и выше деформируемость эритроцитов после нескольких минут инкубации с антибиотиком резко падала до нуля. При концентрациях 0,3 мг/мл клеток и меньше деформируемость эритроцитов оставалась на уровне нормы в течение нескольких часов. Влияние доксорубицина на деформируемость эритроцитов было исследовано на эритроцитах 8 разных доноров в диапазоне концентраций 0,2—1,0 мг/мл клеток при температурах 21° и 37 °С. В половине случаев деформируемость эритроцитов резко снижалась в первые несколько минут пропорционально концентрации доксорубицина, а затем практически не менялась в течение нескольких часов (рис. 3, а). В остальных случаях влияние доксорубицина на деформируемость эритроцитов было подобно влиянию рубомицина (рис. 3, б). Влияние доксорубицина на деформируемость эритроцитов было одинаково при обеих температурах.

Таблица 2

Сравнительные данные о влиянии рубомицина и доксорубицина на скорость выхода K^+ и гемоглобина из эритроцитов. Температура 37 °С. Скорость выхода в % от максимального содержания в эритроците за час

	Выход K^+				Выход гемоглобина (Hb)				
		Рубомицин, мг/мл клеток	Доксорубицин, мг/мл клеток		Контроль	Рубомицин, мг/мл клеток	Доксорубицин, мг/мл клеток		
Контроль	1,0	5,0	0,5	1,0	Контроль	1,0	5,0	0,5	1,0
0,38	1,02	2,10	0,18	0,19	0,03	0,70	1,22	0,03	0,05
0,13	0,40	1,59	0,14	0,23	0,02	0,13	0,80	0,04	0,10

Контроль
доксорубицин
из каждого X 8

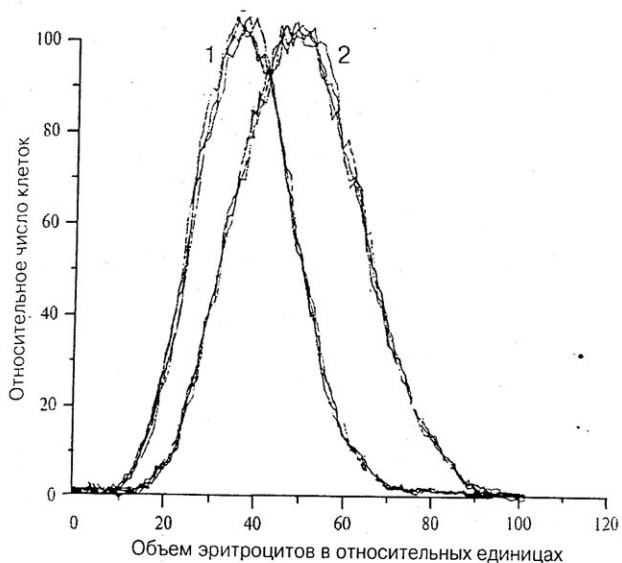


Рис. 1. Распределение эритроцитов по объемам в контрольной суспензии (1) и после 2 ч инкубации суспензии при комнатной температуре с рубомицином в концентрации 5,0 мг/мл клеток (2). Каждое распределение получено в результате четырех последовательных измерений.

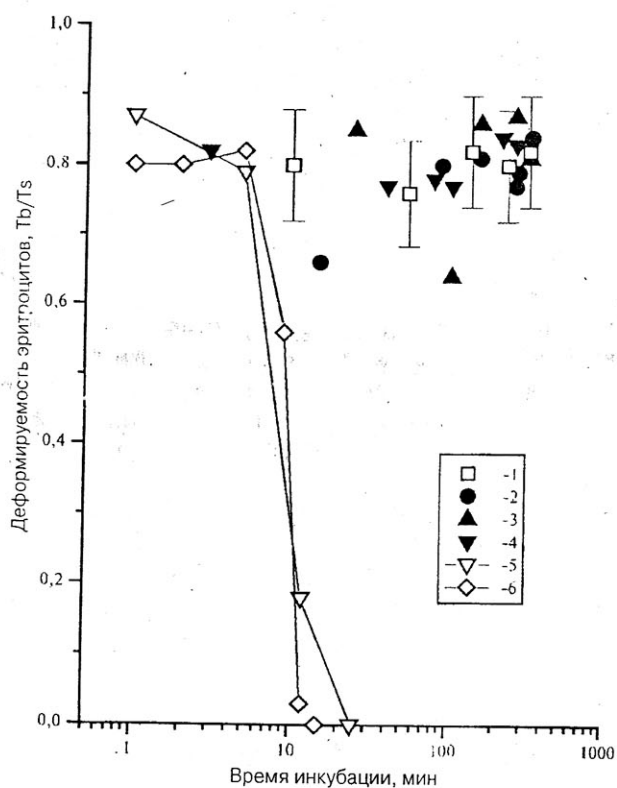


Рис. 2. Влияние рубомицина на деформируемость эритроцитов. Суспензия эритроцитов инкубировалась при комнатной температуре в присутствии различных концентраций рубомицина.
1 — контроль (гематокрит 46%), 2 — 0,2 мг/мл клеток (гематокрит 46%), 3 — 0,3 мг/мл клеток (гематокрит 47%), 4 — 0,4 мг/мл клеток (гематокрит 45%), 5 — 0,6 мг/мл клеток (гематокрит 45%), 6 — 1,0 мг/мл клеток (гематокрит 45%).

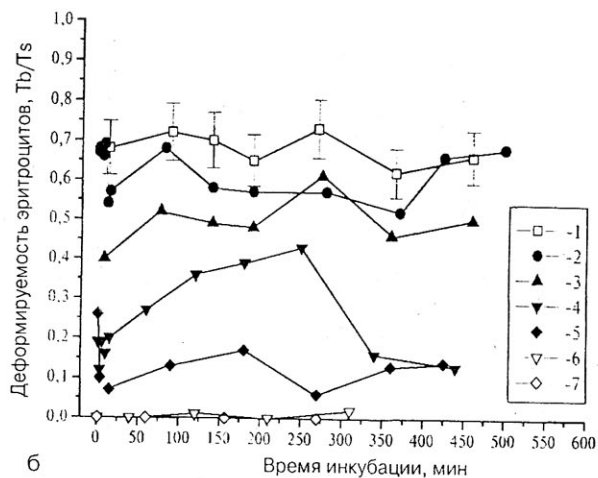
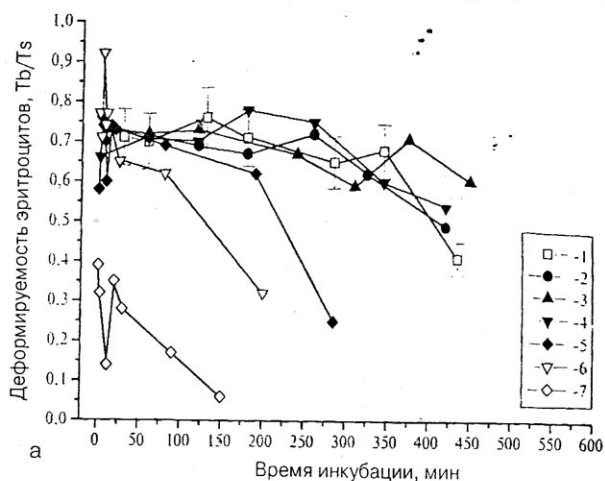


Рис. 3. Влияние доксорубина на деформируемость эритроцитов двух различных доноров (а, б). Суспензия эритроцитов инкубировалась при комнатной температуре в присутствии различных концентраций доксорубина.
1 — контроль, 2 — 0,2 мг/мл клеток, 3 — 0,3 мг/мл клеток, 4 — 0,4 мг/мл клеток, 5 — 0,5 мг/мл клеток, 6 — 0,6 мг/мл клеток, 7 — 1,0 мг/мл клеток. Гематокриты суспензий лежали в пределах 45—50%.

5. Влияние рубомицина и доксорубина на содержание АТФ в эритроцитах. Влияние рубомицина и доксорубина на содержание АТФ в эритроцитах исследовалось при температуре 37 °С при концентрациях рубомицина 1,0 и 5,0 мг/мл клеток и доксорубина 0,5 и 1,0 мг/мл клеток. Полученные результаты показали, что рубомицин и доксорубин существенно не влияют на содержание АТФ в эритроцитах (табл. 3).

Обсуждение

Полученные результаты показывают, что антрациклиновые антибиотики могут вызывать значительное повреждение эритроцитов, проявляющееся в выходе из клеток гемоглобина (Hb) и K⁺, увеличении клеточного объема и снижении их фильтруемости. Интенсивный

Таблица 3

Концентрация АТФ в эритроцитах в процессе их инкубации с рубомицином и доксорубицином (ммоль/л клеток)

Время, ч	Донор	Рубомицин, мг/мл клеток			Доксорубицин, мг/мл клеток		
		0,0	1,0	5,0	0,0	0,5	1,0
1	1-й	2,4	2,1	-	2,5	2,1	-
	2-й	2,7	2,4	2,2	2,6	2,2	2,1
2	1-й	2,6	2,4	2,3	2,1	2,4	2,4
	2-й	2,6	2,2	2,6	2,5	2,2	2,0
3	1-й	2,3	2,4	2,4	2,4	2,4	2,3
	2-й	2,2	2,3	2,4	1,6	2,2	1,6
4	1-й	2,4	1,9	2,0	2,4	2,4	2,3
	2-й	2,6	2,3	2,4	2,5	2,3	2,0
5	1-й	2,4	2,1	1,9	2,1	2,3	1,3
	2-й	2,3	2,3	2,7	2,5	2,4	2,0
6	1-й	2,8	-	1,5	2,2	2,0	2,3
	2-й	2,3	2,2	3,0	2,5	2,3	1,9

выход Hb и K^+ из эритроцитов указывает на их разрушение. Значительное увеличение объема эритроцитов и уменьшение их фильтруемости должно приводить к ухудшению их циркуляции в организме и, как следствие, к удалению их из кровотока.

В то же время в достаточно широком диапазоне концентраций эти антибиотики не вызывают быстрого разрушения эритроцитов, что обеспечивает возможность приготовления нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов, их непродолжительного хранения и использования в терапевтических целях. При полном связывании терапевтической дозы рубомицина (даунорубицина) или доксорубицина (около 80 мг) в стандартной дозе эритроцитарной массы (около 200 мл эритроцитов) концентрация антибиотика в эритроцитах составит 0,4 мг/мл клеток. Как видно из представленных данных, при такой концентрации антибиотика эритроциты могут храниться в течение 2 ч и более без существенной потери гемоглобина и K^+ . При этом надо отметить, что комнатная температура является, по-видимому, оптимальной для хранения нагруженных антрациклиновыми антибиотиками эритроцитов.

Увеличение выхода гемоглобина из эритроцитов при 37 °С вызвано, скорее всего, активацией повреждающего воздействия антрациклиновых антибиотиков на эритроциты. Наблюдаемое в ряде случаев увеличение выхода гемоглобина из эритроцитов при 4 °С объясняется, на наш взгляд, снижением в клетках интенсивности метаболических процессов, противодействующих повреждающему воздействию антрациклиновых антибиотиков. Интересно отметить, что влияние антрациклиновых антибиотиков на деформируемость (фильтруемость) эритроцитов позволяет получать нагруженные этими анти-

биотиками эритроциты с различной способностью к циркуляции. При концентрации антрациклиновых антибиотиков в эритроцитах порядка 0,3 мг/мл клеток, они, по-видимому, способны к нормальной длительной циркуляции. При концентрации антибиотиков порядка 0,6 мг/мл клеток и более эритроциты должны задерживаться в капиллярах органов ретикулоэндотелиальной системы, таких как селезенка и печень. Такие эритроциты могут быть использованы для преимущественной доставки антрациклиновых антибиотиков в эти органы.

Точные механизмы повреждающего воздействия антрациклиновых антибиотиков на эритроциты не ясны. Понятно, однако, что существенную роль в повреждении эритроцитов антрациклиновыми антибиотиками может играть влияние этих антибиотиков на различные компоненты клеточной мембраны. Ранее было показано, что доксорубицин может влиять на Са-зависимый выход K^+ из эритроцитов [13]. Наши данные о постоянстве концентрации АТФ и небольшом увеличении объема эритроцитов при значительном выходе из них K^+ в присутствии антрациклиновых антибиотиков указывают на подавление транспортной Na, K-ATF азы этими антибиотиками.

Литература

1. Атауллаханов Ф.И., Пичугин А.В. Модификация люцефирин-люциферазного метода определения концентрации АТФ в эритроцитах // Биофизика.— 1981.—Т. 26.—С. 86—90.
2. Атауллаханов Ф.И., Баташева Т.В., Витвицкий В.М., Комарова С.В. Влияние обработки глутаровым альдегидом на выход рубомицина и гемоглобина из нагруженных рубомицином мышинных эритроцитов // Биотехнология.— 1993.—№ 2.—С. 40—44.
3. Атауллаханов Ф.И., Баташова Т.В., Витвицкий В.М. Влияние температуры, концентрации даунорубицина и гематокрита суспензии на связывание даунорубицина эритроцитами человека // Антибиотики и химиотерапия.— 1994.—№ 39.—С. 9—10.
4. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л., Тужилова Е.Г. Анализ геометрических параметров и механических свойств эритроцитов методом фильтрации через мембранные ядерные фильтры: 1. Математическая модель // Биофизика.— 1994.—Т. 39.—С. 672—681.
5. Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики.—М.: Медицина, 1987.
6. Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И., Тужилова Е.Г., Витвицкий В.М. Анализ геометрических параметров и механических свойств эритроцитов методом фильтрации через мембранные ядерные фильтры:

2. Экспериментальная проверка математической модели // Биофизика.—1994.—Т. 39.—С. 864—872.
7. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клиническая фармакология.—М.: Медицина, 1993.
8. Противоопухолевая химиотерапия: Справочник.—М.: Медицина, 1993.
9. Руденко С.В., Нипот Е.Е., Павлюк О.М. Влияние ионов Zn на гемолиз эритроцитов, вызванный мелитином // Биохимия.—1995.—Т. 60.—С. 723—733.
10. Ataullakhanov F.I., Vitvitsky B.M., Kovaleva V.L., Mironova B. Rubomicin loaded erythrocytes in the treatment of mouse tumor P388 // *Advan. Experim. Med. and Biol.*—Vol. 326.—New York, London: Plenum Press, 1992.
11. Ataullakhanov F.I., Kulikova E.V., Vitvitsky B.M. et al. Treatment of Rausher Virus Induced Erythroblastic Leukemia with Rubomycin Loaded Erythrocyte // *Advan. Biosciences.*—1994.—Vol. 92.—P. 177—183.
12. Ataullakhanov F.I., Isaev V.G., Kohno A.V. et al. Pharmacokinetics of Doxorubicin in patients with lymphoproliferative disorders after infusion of Doxorubicin-Loaded Erythrocytes // *Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine.*—New York, London: Plenum Press, 1997.
13. Davtyan T.K., Gyulkhandanyan A.V., Gambarov S.S. et al. The effects of adriamycin and adriamycin complexes with transitional metals on Ca(2+)-dependent K⁺ channels of human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.*—1996.—Vol. 17.—P. 182—190.
14. Gaudreault R.C., Bellemare B., Lacroix J. Erythrocyte membrane-bound daunorubicin as a delivery system in anticancer treatment // *Anticancer Res.*—1989.—Vol. 9.—P. 1201—1205.
15. Kitao T., Hattori K. Erythrocyte entrapment of daunorubicin by amphotericin B without hemolysis // *Cancer Res.*—1980.—Vol. 40.—P. 1351—1353.
16. Matherné C.M., Satterfield V.C., Gasparini A., et al. Clinical efficacy and toxicity of doxorubicin encapsulated in glutaraldehydetreated erythrocytes administered to dogs with lymphosarcoma // *Amer. J. Vet. Res.*—1994.—Vol. 55.—P. 847—853.
17. Tonetti M., Bartolini A., Sobrero A. et al. Organ distribution of glutaraldehyde treated erythrocytes in patients with hepatic metastases // *Advan. Biosciences.*—1994.—Vol. 92.—P. 169—176.
18. Zocchi E., Tonetti M., Polvani C. et al. In vivo liver and lung targeting of adriamycin encapsulated in glutaraldehyde-treated murine erythrocytes // *Biotechnol. Appl. Biochem.*—1988.—Vol. 10.—P. 555—562.
19. Zocchi E., Tonetti M., Polvani C. et al. Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*—1989.—Vol. 86.—P. 2040—2044.

Поступила в редакцию 30.09.98 г.

*A.A.Skorokhod, V.M.Vitvitsky,
R.A.Kulmann, F.I.Ataullakhanov*

DETRIMENTAL EFFECTS OF DAUNORUBICIN AND DOXORUBICIN ON HUMAN ERYTHROCYTES (IN VITRO)

Center for Hematological Research, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

In isotonic medium, daunorubicin in the concentration range of 0.5—5.0 mg/ml of cells and doxorubicin in the concentration range of 0.2—1.0 mg/ml of cells caused hemoglobin (Hb) and K⁺ to efflux from red blood cells (RBC), to increase RBC size and to lower their deformability. Hb and K⁺ efflux rates were proportional to the antibiotic concentrations and remained stable for a few hours. Hb efflux did not change significantly in the 4—21 °C range (exempt at an experimental concentration of daunorubicin of 5.0 mg/ml of cells) but soared sharply at 37 °C. At the daunorubicin and doxorubicin concentration of 0.2 mg/ml of cells, Hb and K⁺ efflux virtually did not differ from control values. At the antibiotic concentration of 1.0 mg/ml of cells, 37 °C, Hb efflux rate was 0.34—5.6%, while that of K⁺ — 1.0—8.2%, per hour, of possible maximum value. For the daunorubicin level of 5.0 mg/ml of cells, the respective values were 10 and 17%. At the daunorubicin concentration of 5.0 mg/ml, at 4 °C, Hb efflux from RBC was significantly higher than at 21 °C. RBC malleability, which was determined as their ability to pass through membrane filters having 3 mm dia pores, did not differ significantly from control values for a few hours antibiotic concentrations not exceeding 0.3 mg/ml of cells. At the antibiotic concentration of 1.0 mg/ml and higher RBC deformability dropped to zero within 10 min. ATP level in RBC practically remained identical to control values during incubation with the antibiotics for several hours.