

# ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

## ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРАНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ

Н. Н. Пшенкина<sup>1</sup>

В экспериментах на кроликах исследовали содержание в крови бендазола, верапамила, дротаверина и кеторолака после их внутривенного введения отдельно и после инфузии перфторуглеродного кровезаменителя перфторана (5 мл/кг). Установлено, что на фоне перфторана увеличивается содержание в крови верапамила, дротаверина и бендазола, имеющих значения логарифма распределения в системе октанол/вода ( $\log P$ ) 4,5; 4,9 и 3,5, соответственно. Влияние перфторана на динамику концентраций кеторолака ( $\log P = 2,2$ ) было менее выраженным. В опытах *in vitro* установлено, что перфторан обладает выраженной сорбционной активностью в отношении верапамила, дротаверина и бендазола и слабой активностью в отношении кеторолака. Вероятно, инфузия гидрофобной наноземulsion перфторан приводит к увеличению сорбционной емкости крови, что создает предпосылки к перераспределению препаратов и повышению их концентрации в крови.

**Ключевые слова:** лекарственные взаимодействия, наносистемы, кровезаменитель, перфторан

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема внедрения в медицину, в частности, в фармакологию, наноматериалов имеет множество аспектов, одним из которых является взаимодействие наносистем с малыми молекулами, циркулирующими в кровотоке. Результатом таких взаимодействий может стать изменение эффективных доз лекарственных препаратов, параметров их распределения и элиминации, появление побочных реакций. К числу нанопрепаратов, полученных с использованием наукоемких технологий, относится искусственный кровезаменитель с газотранспортными свойствами перфторан (НПО “Перфторан”, Пушкино, Московская область), представляющий 10 об. % эмульсию перфторуглеродов со средним диаметром частиц 50 – 70 нм [1].

Перфторан зарекомендовал себя как эффективное трансфузионное средство для лечения гипоксии и ишемии различного генеза, в том числе при кровопотерях, травмах, нарушениях кровообращения и микроциркуляции, при шоке, интоксикациях, при лечении ожогов, в онкологии, в хирургической практике и др. [3, 4, 9]. Клинические наблюдения и экспериментальные исследования показывают, что перфторан оказывает не только газотранспортный эффект, но и проявляет свойства, которые определяются его нанодисперсной структурой [2, 11]. К числу негазотранспорт-

ных эффектов перфторана можно отнести его влияние на фармакокинетику лекарственных веществ [5 – 7].

При внутривенном введении перфторан привносит в кровяной ток значительную поверхность раздела фаз, образуемую частицами эмульсии, площадь поверхности которых в 1 мл кровезаменителя составляет около 10 м<sup>2</sup>. Представляется, что поверхностная активность частиц эмульсии может являться фактором, оказывающим существенное влияние на параметры фармакокинетики лекарственных средств при их комплексном использовании с кровезаменителем. Анализ сорбционной способности перфторана в отношении ряда липофильных лигандов и оценка влияния этого процесса на содержание лекарственных веществ в крови при сочетанном использовании в эксперименте кровезаменителя и лекарственных препаратов составили цель настоящего исследования.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на кроликах-самцах породы Шиншилла массой тела 2,8 – 3,5 кг. Животных содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе. В ходе эксперимента животных подвергали мягкой фиксации, не оказывающей болевого воздействия, в связи с чем методы анестезии не применяли.

В работе исследовали лекарственные препараты: дибазол (бендазол, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 1 %; “Ай Си Эн Октябрь”, Россия), верапамил (раствор для внутривенного введения 2,5 мг/мл; “Биосинтез”, Россия); но-шпа (дротаверин, раствор для инъекций 2 %; “Chinoin”, Венгрия);

<sup>1</sup> НИЛ лекарственной и экологической токсикологии (зав. — акад. РАМН Г. А. Софронов) Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

кеторолак (раствор для внутривенного и внутримышечного введения 30 мг/мл; “Синтез АКО”, Россия). Перфторан (ОАО “НПФ Перфторан”, Россия) использовали в лекарственной форме 10 % эмульсия для инфузий во флаконах по 200 мл.

Перфторан во всех экспериментах вводили медленно в краевую вену уха кроликов в постоянной дозе 5 мл/кг массы тела. Животным контрольных групп вместо перфторана в том же объеме вводили физиологический раствор. Сразу после окончания инфузии перфторана (или физраствора) в вену другого уха вводили лекарственные препараты в следующих дозах: дибазол — 5 мг/кг, верапамил — 0,5 мг/кг, но-шпа (дротаверин) — 6 мг/кг, кеторолак — 3 мг/кг. Каждая экспериментальная группа состояла из 5 животных.

Кровь для анализа отбирали из краевой вены уха в пробирки с гепарином через 0,08 – 0,25 – 0,5 – 1 – 1,5 – 3 – 5 – 24 ч после окончания введения лекарственных препаратов. К 2 мл плазмы добавляли по 350 мг кристаллического хлорида натрия для солевой диссоциации лиганд-протеиновых комплексов, затем в пробы вносили по 0,1 мл водного раствора внутреннего стандарта концентрацией 0,1 мг/мл. При определении бендазола и кеторолака внутренним стандартом служил дротаверин; при анализе дротаверина — бендазол; верапамила — папаверин. При анализе бендазола, дротаверина и верапамила пробы подщелачивали добавлением 0,3 мл 25 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ . При анализе кеторолака пробы подкисляли добавлением 0,2 мл концентрированной  $\text{HCl}$ . Лекарственные вещества экстрагировали метиленхлоридом, отбирали органическую фазу и досуха упаривали в токе азота. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл этанола и использовали для хроматографического анализа. Количественный анализ лекарственных веществ проводили на жидкостном хроматографе “Perkin-Elmer”, модель 601 (США), на колонке Lichrosorb C18 длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь, содержащую 35 % ацетонитрила, 25 % 0,05 M TRIS буфера pH 7,4 и 40 % воды. Детектирование — фотометрическое при длине волны  $\lambda = 254$  нм.

Сорбционную активность перфторана оценивали с помощью метода равновесного диализа, используя полупроницаемые мембраны с размером пор 12 – 14 кДа производства “Orange Scientific” (Бельгия). При проведении диализа внутрь диализной камеры вносили 5 мл перфторана и 0,5 мл раствора лекарственного вещества в диапазоне концентраций от 12,5 до 200 мкМ в расчете на конечную концентрацию в диализной системе. После преинкубации перфторана с лекарственным веществом пробы диализировали против 20 мл 0,1 M Na-фосфатного буфера pH 7,4 при комнатной температуре в течение 18 ч. В контрольных пробах вместо перфторана использовали фосфатный буфер. После окончания диализа концентрации лекарств в диализатах контрольных и опытных проб определяли по поглощению в области максимума, специфичного для

исследуемого препарата. Количество связанного лекарства  $C_i$  рассчитывали как разность между полной концентрацией, внесенной в диализную систему, и концентрацией свободного препарата, определяемого в диализате:

$$C_i = \frac{L_0 - L_i(V_1 + V_2)}{L_0}, \quad (1)$$

где  $L_0$  — полная концентрация лекарства, внесенного в систему;  $L_i$  — концентрация свободного лекарства,  $V_1$  и  $V_2$  — объемы внутренней и внешней камер, соответственно.

Для расчета параметров взаимодействия лигандов с перфтораном использовали уравнение Скетчарда [12]:

$$C_i/L_i = K_{aff}(nR_0 - C_i), \quad (2)$$

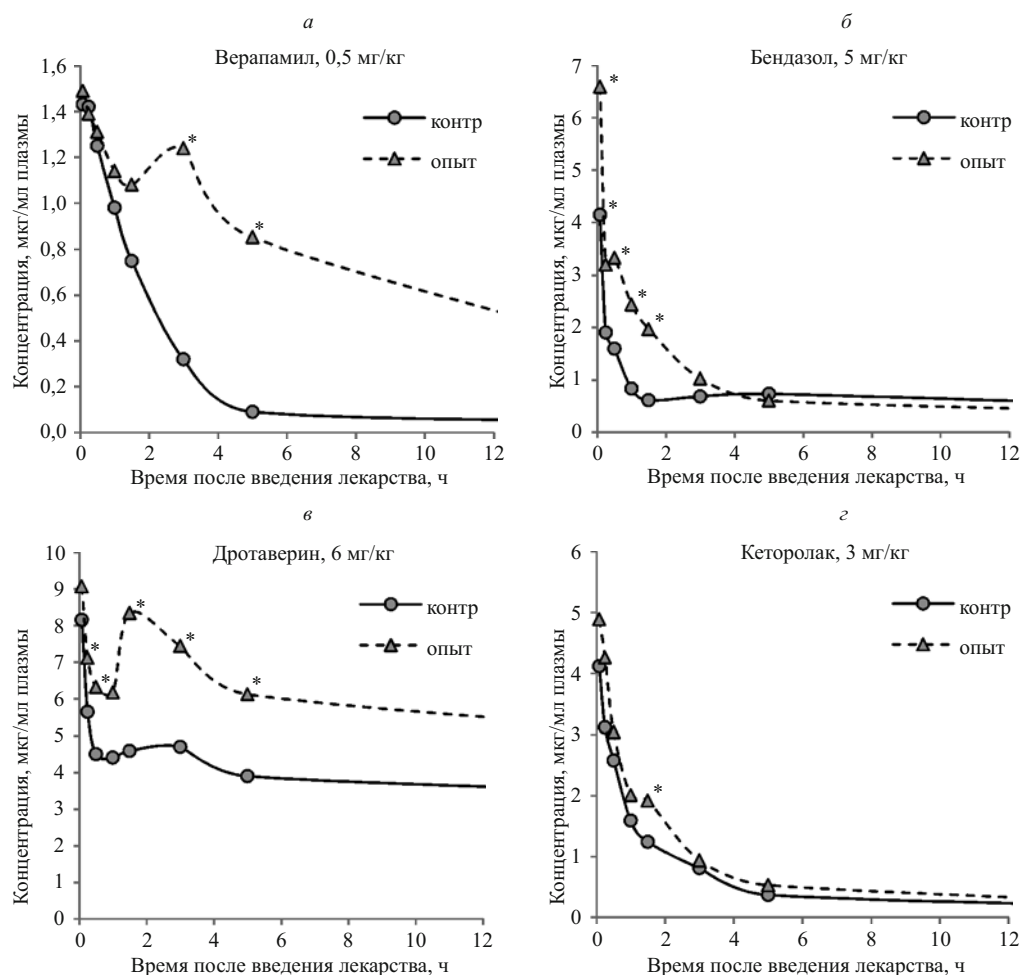
где  $C_i$  — концентрация образовавшегося комплекса,  $L_i$  — концентрация свободного лиганда,  $R_0$  — концентрация перфторана,  $n$  — число мест связывания. На графике, построенном в координатах  $C_i/L_i$  от  $C_i$ , прямая имеет наклон, соответствующий  $-K_{aff}$ , и пересекает ось ординат в точке  $nK_{aff}R_0$ .

Расчет результатов и статистическую обработку данных выполняли с использованием Microsoft Excel 2007 и статистического пакета SPSS v.17. Сопоставление данных, полученных для контрольных и опытных групп, проводили с применением t-критерия Стьюдента, статистически значимыми принимали межгрупповые различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены изменения усредненных внутригрупповых концентраций лекарственных веществ после внутривенного введения препаратов отдельно и после инфузии перфторана. Как видно, динамика концентраций лекарственных веществ в условиях их совместного введения с перфтораном характеризуется значительной вариабельностью. В ряде случаев (например, для верапамила и дротаверина, рис. 1, а, в) зависимость концентрации от времени не соответствует кривой, характерной для кинетики лекарств при внутривенном введении. Колебания концентраций и появление дополнительных максимумов через 1 – 3 ч после введения делают невозможным использование одно- или двухкамерных моделей для расчета параметров фармакокинетики. В подобных случаях для анализа фармакокинетики рекомендуется использовать вычисление площади под концентрационной кривой за период наблюдения, а также величину максимальной концентрации и время ее достижения [8]. Следуя данным рекомендациям, площадь под кривой “концентрация — время” за 5-часовой период наблюдения  $AUC_5$  рассчитывали методом трапеций.

Поскольку определить максимальную концентрацию в наших опытах не представляется возможным, для характеристики процесса во времени был введен



**Рис. 1.** Динамика концентраций лекарственных веществ в плазме крови кроликов после внутривенного введения препаратов раздельно и на фоне инфузии перфторана.

Контроль — физиологический раствор в вену, 5 мл/кг; затем лекарственный препарат в использованной дозе; опыт — перфторан в вену, 5 мл/кг; затем лекарственный препарат в соответствующей дозе; \* — статистически значимые различия концентраций лекарств в точке наблюдения между контрольной и опытной группами ( $p < 0,01$ ).

параметр  $T_{50}$ , который равен времени достижения половинной концентрации, накопленной за 5 часов. Значение  $T_{50}$  вычисляли, находя координаты точки

$0,5AUC_5$  на кумулятивной кривой концентрации от времени. Результаты, полученные при расчетах  $AUC_5$  и  $T_{50}$ , представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Площадь под концентрационной кривой за 5-часовой период наблюдения и время достижения половинной наблюдаемой концентрации лекарственных средств в крови животных после введения препаратов раздельно или в сочетании с перфтораном

Препарат, доза в вену	Группы животных	$AUC_5$ , мг · ч/л	$t$	$T_{50}$ , ч	$t$
Бендазол, 5 мг/кг	Контроль	$7,10 \pm 0,15$		$1,26 \pm 0,04$	
	Опыт	$10,97 \pm 0,71$	5,34	$1,19 \pm 0,10$	- 0,64
Верапамил, 0,5 мг/кг	Контроль	$2,96 \pm 0,10$		$2,39 \pm 0,14$	
	Опыт	$5,85 \pm 0,24$	11,3	$2,43 \pm 0,14$	0,18
Дротаверин, 6 мг/кг	Контроль	$23,61 \pm 0,88$		$2,57 \pm 0,08$	
	Опыт	$36,36 \pm 2,13$	5,52	$2,46 \pm 0,06$	- 1,14
Кеторолак, 3 мг/кг	Контроль	$12,73 \pm 1,29$		$1,18 \pm 0,05$	
	Опыт	$16,32 \pm 1,54$	1,79	$1,25 \pm 0,05$	0,97

**Примечание.** Контроль — введение лекарственного препарата в соответствующей дозе сразу после инфузии физраствора (5 мл/кг); опыт — введение препарата сразу после инфузии перфторана (5 мл/кг);  $AUC_5$  — площадь под фармакокинетической кривой за 5-часовой период наблюдения;  $T_{50}$  — время достижения половинной концентрации, наблюдаемой за 5 ч;  $t$  — критерий Стьюдента оценки значимости различий между опытной и контрольной группами.

Как видно в табл. 1, при внутривенном введении бендазола, верапамила и дротаверина на фоне инфузии перфторана площадь под кривой концентрации от времени после введения  $AUC_5$  увеличивалась по сравнению с контролем с высоким уровнем статистической значимости. В случае кеторолака различий по данному параметру между контрольной и опытной группами не выявлено. По показателю времени достижения половины наблюдаемой концентрации не обнаружено различий между группами ни для одного из исследованных препаратов.

Возможной причиной увеличения концентраций лекарств в условиях их введения на фоне инфузии перфторана является адсорбция лекарственных веществ на поверхности частиц эмульсии кровезаменителя. Для проверки данного предположения были проведены эксперименты *in vitro*, в которых с помощью метода равновесного диализа оценивали сорбционную активность лигандов в отношении перфторана.

Графики Скетчарда, полученные при исследовании связывания с перфтораном бендазола, верапамила, дротаверина и кеторолака, приведены на рис. 2. Как видно, верапамил и дротаверин достаточно активно взаимодействовали с перфтораном. На графике они дают прямые с большим отрицательным углом наклона, пересекающие ось ординат в области высоких значений. Константы взаимодействия  $K_{aff}$ , рассчитанные для этих соединений, составили соответственно  $4,75 \cdot 10^4$  и  $5,17 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  (табл. 2). Степень связывания с перфтораном для этих лигандов была оценена на уровне 60 – 80%.

В табл. 2 также приведены данные о липофильности исследованных лигандов, рассчитанные на базе структурных формул соединений с помощью молекулярного web-калькулятора [10]. Важно отметить, что из числа исследованных в работе лекарственных веществ верапамил и дротаверин являются наиболее липофильными и обладают наибольшим сродством к перфторану (табл. 2). Кеторолак, обладающий слабой липофильностью, проявлял наименьшее среди исследованных веществ сродство к эмульсии.

Очевидно, существует зависимость между увеличением концентраций лекарств в крови и сорбционной активностью лигандов. По приблизительным расчетам, 1 л перфторана способен адсорбировать, в среднем,  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  лекарственного вещества, обладающего высоким сродством к эмульсии. Для сравнения, альбумин, концентрация которого составляет примерно 0,6 мМ, при расчете на один центр связывания лиганда в молекуле белка и при его 100 %-ном насыщении (чего в реальных условиях не достигается), может связать около  $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  лекарственного вещества. Как видим, сорбционная емкость перфторана сопоставима с таковой естественных транспортных систем крови.

В результате увеличения сорбционной емкости крови может происходить изменение содержания свободных лигандов в крови, что, в свою очередь, будет при-

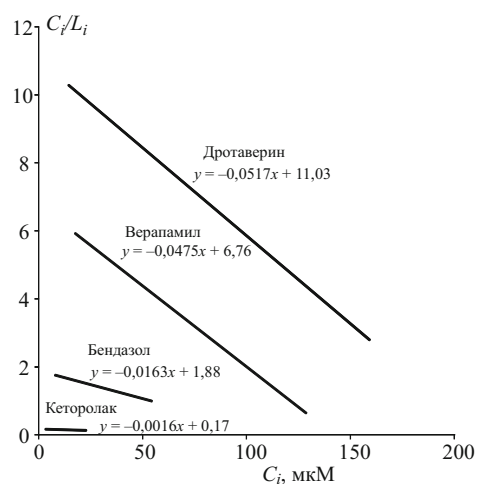


Рис. 2. Графики Скетчарда для взаимодействия с перфтораном бендазола, верапамила, дротаверина и кеторолака.

По оси абсцисс — концентрация связанного лиганда, мкМ; по оси ординат — отношение концентрации связанного лиганда к концентрации свободного.

водить к изменению градиента концентраций между кровью и тканями. Результатом этого процесса может стать перераспределение лекарственных веществ, в том числе усиление их реабсорбции в кровотоке. Вероятно, этим объясняется наблюдаемое нами появление дополнительного максимума концентраций через 1 – 3 ч после введения верапамила и дротаверина на фоне инфузии перфторана.

В заключение хотелось бы отметить, что изменение параметров фармакокинетики лекарственных веществ при их сочетанном использовании с перфтораном, по-видимому, не является исключительной прерогативой кровезаменителя. Поскольку высокая поверхностная активность — общее свойство нанопрепаратов и наносистем, следует ожидать, что подобные фармакокинетические отклонения могут наблюдаться при комплексном применении лекарственных препаратов и с другими наносистемами. Этот аспект наномедицины требует детального исследования.

Таблица 2. Липофильность лигандов и параметры и взаимодействия лекарственных веществ с перфтораном *in vitro*

Препарат	Log P	Параметры взаимодействия с перфтораном		
		Константа взаимодействия, $K_{aff}$ ( $\text{M}^{-1}$ )	Число центров связывания, n	Степень связывания, %
Бендазол	3,5	$1,63 \cdot 10^4$	115,5	53,69
Верапамил	4,5	$4,75 \cdot 10^4$	142,2	64,16
Дротаверин	4,9	$5,17 \cdot 10^4$	213,3	81,63
Кеторолак	2,2	$1,62 \cdot 10^3$	106,1	11,39

## ВЫВОДЫ

1. Динамика концентраций лекарственных веществ при их внутривенном введении в сочетании с инфузией искусственного кровезаменителя перфторана претерпевает существенные изменения, которые заключаются в увеличении содержания лекарственных веществ в крови и появлении дополнительных максимумов.

2. Перфторуглеродная наноэмульсия перфторан обладает сорбционной активностью в отношении липофильных лигандов, что приводит к увеличению сорбционной емкости крови при инфузии кровезаменителя и, в свою очередь, может служить причиной искажения фармакокинетики в результате перераспределения лекарственных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Р. Иваницкий, *Биофизика*, **46**(1), 5 – 33 (2001).
2. Г. Р. Иваницкий, *Биофизика*, **53**(2), 367 – 377 (2008).

3. *Перфторан в медицине катастроф Кузбасса: Рук. для врачей*, (А. Л. Кричевский, И. К. Галеев, ред.), Кемерово (2007).
4. *Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии*, ОНТИ ПНЦ РАН, Пушкино (2004).
5. Н. Н. Пшенкина, Н. Б. Андреева, Е. В. Мурзина и др., *Вестн. Рос. военно-мед. акад.*, **13**(1), 54 – 57 (2005).
6. Н. Н. Пшенкина, Н. Б. Андреева, Е. В. Мурзина и др., *Общая реаниматология*, **3**(3/1), 25 – 30 (2007).
7. Н. Н. Пшенкина, Г. А. Софронов, Н. Б. Андреева и др., *Вестн. Рос. военно-мед. акад.*, **20**(4), 99 – 104 (2007).
8. А. А. Фирсов, В. П. Жердев, Е. Ю. Барманова и др., *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000), сс. 107 – 113.
9. E. Maevsky, G. Ivanitsky, L. Bogdanova, et al., *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.*, **33**, 37 – 46 (2005).
10. *Molinspiration web-calculator*: <http://www.molinspiration.com>.
11. O. Rafikova, E. Sokolova, R. Rafikov, E. Nudler, *Circulation*, **110**, 3573 – 3580 (2004).
12. G. Scatchard, *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 – 672 (1949).

Поступила 06.04.11

## INFLUENCE OF PERFTORAN NANOEMULSION ON BLOOD PLASMA CONCENTRATIONS OF LIPOPHILIC DRUGS

N. N. Pshenkina

St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Akad. Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044, Russia

The influence of perfluorocarbon blood substitute Perftoran on the plasma concentrations of bendazole, drotaverine, ketorolac and verapamil upon intravenous introduction after Perftoran infusion (5 ml/kg) has been investigated on rabbits. It has been found that the plasma concentrations of verapamil, drotaverine and bendazole (highly lipophilic drugs with  $\log P = 4.5, 4.9$  and  $3.5$ , respectively) increased in the presence of Perftoran. The influence of Perftoran on the concentration of weakly lipophilic ketorolac was less significant. Perftoran effectively bound drotaverine, ketorolac and verapamil *in vitro*, whereas the binding of ketorolac by the emulsion particles was weak. Evidently, the infusion of hydrophobic nanoemulsion Perftoran elevates the sorption capacity of plasma and creates prerequisites for the redistribution drugs and favors increase in their concentrations.

**Key words:** Drug interactions, nanosystems, blood substitutes, Perftoran