

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ РАН
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ФИРМА "ПЕРФТОРАН"

ПРЕПРИНТ

ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫЕ ЭМУЛЬСИИ



ПУЩИНО • 1993

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
PUSHCHINO RESEARCH CENTER
INSTITUTE OF THEORETICAL AND
EXPERIMENTAL BIOPHYSICS
PHARMACEUTICAL COMPANY PERFTORAN

PREPRINT

PERFLUOROCARBON EMULSIONS

PUSHCHINO • 1993

Материалы подготовили:

Воробьев С. И.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Иваницкий Г. Р.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (научный руководитель)
Макаров К. Н.	Институт элементоорганических соединений РАН
Мороз В. В.	Главный военный клинический госпиталь им. Н. Н. Бурденко
Кузнецова И. Н.	Институт гематологии и переливания крови
Онищенко Н. А.	Институт трансплантологии и искусственных органов РАН
Кутышенко В. П.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Склифас А. Н.	Институт биофизики клетки РАН
Шипунова Н. А.	Институт биофизики клетки РАН
Пономарчук В. В.	Институт биофизики клетки РАН
Архипов В. В.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Бобровский Р. В.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Ладилев Д. В.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Маевский Е. И.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Исламов Б. И.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Кравченко В. В.	Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Раков Б. Н.	Кирово-Чепецкий химкомбинат
Захаров В. П.	Кирово-Чепецкий химкомбинат
Быстрицкий Г. М.	Институт органических полупродуктов и красителей
Елецкая С. В.	Институт органических полупродуктов и красителей
Заболоцких В. Ф.	Пермский филиал НПО ГИПХ
Бильдинов И. К.	Пермский филиал НПО ГИПХ
Сенина Р. Я.	Фармацевтическая фирма Перфторан
Старовойтова Л. Н.	Фармацевтическая фирма Перфторан
Кулакова Г. М.	Фармацевтическая фирма Перфторан
Прьев Н. В.	Фармацевтическая фирма Перфторан

В области создания искусственных кровезаменителей с газотранспортной функцией существуют два альтернативных направления: первое - это использование в качестве субстрата, переносящего газ, эмульсии перфторуглеродов, и второе - использование модифицированного гемоглобина в роли переносчика газов. На одном из последних Международных симпозиумов по искусственным кровезаменителям (1991г. Канада) из 181 доклада 2/3 были посвящены модифицированному гемоглобину, 1/3 - перфторуглеродным эмульсиям. Наибольшее количество докладов было представлено из США.

В идеях этих двух направлений много общего, но в реализации они существенно отличаются друг от друга. Использование модифицированного гемоглобина из эритроцитов человека по своим газотранспортным свойствам оказалось более эффективным, но из-за токсичности этих препаратов Food and Drug Administration (аналог нашего Фармкомитета) не дал разрешение на их клиническое применение. Специалисты пока не достигли необходимого контроля над реакциями, которые модифицируют сложную и хрупкую молекулу гемоглобина. Кроме этого, технология обработки крови, ее очистка, выделение гемоглобина и соответствующая его модификация остаются проблематичными.

К применению перфторуглеродных эмульсий в клинике до недавнего времени относились предвзято, поскольку первый коммерческий препарат на этой основе Флюозол-ДА фирмы "Грин Кросс Корпорейшен" имел ограниченную эффективность. Инертность мышления и консерватизм медицинской среды рождали скептическое отношение к этому необычному классу кровезаменителей. Food and Drug Administration долго не давал разрешения на его клиническое использование, хотя различные научные группы и фирмы продолжали интенсивно работать в этом направлении.

Ситуация существенным образом изменилась, когда в 1990 году было получено одобрение на использование Флюозола-ДА в клинике в качестве

переносчика кислорода при оксигенации клеток миокарда. Это был не столько научный прорыв (он произошел значительно раньше), сколько социально-психологический, так как был преодолен барьер консервативности.

В настоящее время проходит клиническую апробацию еще ряд новых препаратов второго поколения, в частности, Oxugent и Imagent американской фирмы "Alliance" Pharmac. Corp. Кроме указанных фирм, интенсивно занимаются в этой области уже известные фирмы: Альфа Терапьютик (США); Adox Adamantech (США).

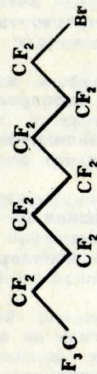
В Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН и Фармацевтической фирме "Перфторан" проводятся исследования по следующим направлениям:

- I. Изучение кардиоплегического состава для операций на открытом сердце на основе эмульсии: перфтордекалин/перфтортрибутиламин, ПФД/ПФТБА (7/3) - "Фторэм"
- II. Изучение перфузионного состава для сохранения изолированных органов на основе эмульсии: перфторметилциклогексилпиперидин, ПФМЦП - "Перфузоль"
- III. Изучение плазмозаменителя с газотранспортной функцией на основе эмульсии: перфтордекалин/перфторметилциклогексилпиперидин, ПФД/ПФМЦП (2/1) - "Перфторан"
- IV. Изучение рентгеноконтрастных сред для диагностики на основе эмульсии: перфтороктилбромид/перфторметилциклогексилпиперидин, ПФОБ /ПФМЦП (2/1) - "ВИММ-РК".

Химическая структура используемых перфторорганических соединений представлена на рисунке 1.

I. Первое направление - разработка кардиоплегического состава для операций на открытом сердце увенчалось созданием в 1981г. препарата "Фторэм" (табл.1). Данная эмульсия обладает повышенной стабильностью.

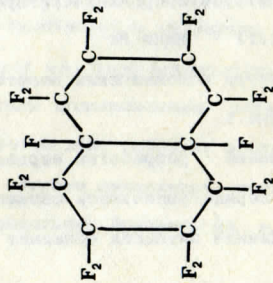
перфторгектилбромид



PFOB

$C_6F_{17}Br = 499$ $T_{1/2} = 4d$
 $O_2/CO_2 \text{ dissol} : 50/210 \text{ vol}\%$

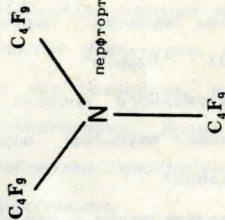
перфтордекалин



PFD

$C_{10}F_{18} = 462$ $T_{1/2} = 7d$
 $O_2/CO_2 \text{ dissol} : 40/190 \text{ vol}\%$

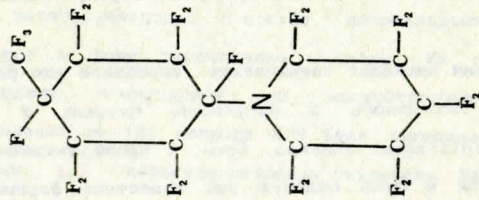
перфтортрибутиламин



PFTBA

$C_{12}F_{27}N = 671$ $T_{1/2} = 900d$
 $O_2/CO_2 \text{ dissol} : 39/152 \text{ vol}\%$

перфторгетилпиперидинсультимперидин



PFTMSP

$C_{14}F_{23}N = 595$ $T_{1/2} = 90d$
 $O_2/CO_2 \text{ dissol} : 40/150 \text{ vol}\%$

Рис. 1. Химическая структура используемых перфторорганических соединений

Таблица 1

Cardioplegic perfluorocarbon emulsion - FTOREM
 Кардиоплегическая перфторуглеродная эмульсия - ФТОРЭМ

COMPONENTS - СОСТАВ :

PFTBA	- перфтортрибутиламин (M _w - 671Д)	8г
PFD	- перфтордекалин (M _w - 462Д)	14г
Pluronic	- проксанол (M _w - 7200Д, ПОПР < 20%)	3г
NaCl *	- натрия хлорид	0,8г
KCl	- калия хлорид	0,11г
MgCl ₂	- магния хлорид	0,012г
CaCl ₂	- кальция хлорид	0,004г
NaH ₂ PO ₄	- натрия гидрофосфат	0,02г
NaHCO ₃	- натрия гидрокарбонат	0,13г
Glucose	- глюкоза	0,2г
H ₂ O	- вода для инъекции	до 100мл

PROPERTY - СВОЙСТВА :

F ⁻	- содержание ионов фтора	< 10 ⁻⁵ М
Av. diameter	- средний диаметр частиц	0,07-0,11мкм
Osmolarity	- осмотичность	340-360мОсм
Viscosity	- вязкость	2,5сП
pH		7,4-7,8
Vol.%O ₂	- растворимость O ₂ (pO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	~ 7,0об%
Vol.%CO ₂	- растворимость CO ₂ (pCO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	~ 80об%

* состав солевой композиции может изменяться и дополняться

II. Второе направление - разработка перфузионного состава для сохранения изолированных органов завершилась созданием в 1982г. препарата "Перфузол" (табл. 2). Данный перфторуглерод II поколения имел циклическую структуру и гетероатом азота, его эмульсии обладали достаточной стабильностью и выводились из организма (табл. 7). На данном препарате (разведенном в 2 раза) успешно проведена суточная консервация (при +4°C) донорского сердца в эксперименте с его последующей гетеротопической пересадкой и реципиенту и оценкой функциональной деятельности в течение 6 часов.

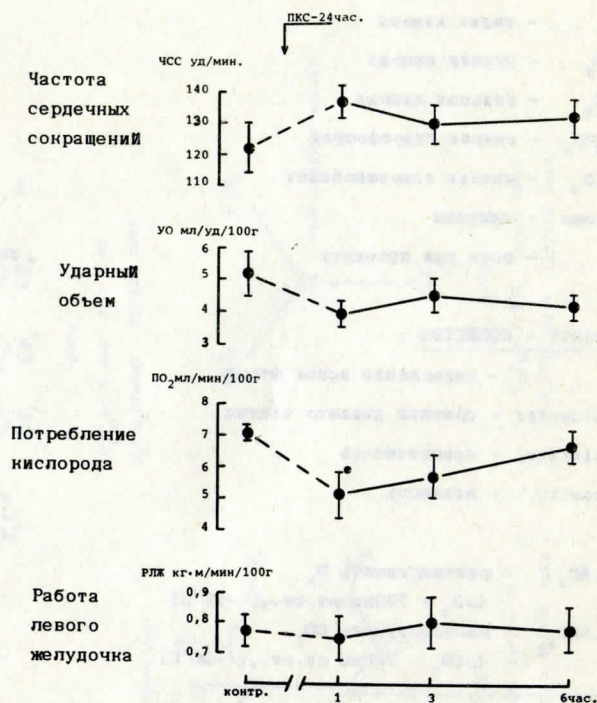


Рис. 2. ПКС-перфузия коронарных сосудов сердца в течение 24 часов

Таблица 2.

Perfusion perfluorocarbon emulsions - PERFUSOL

Перфузионная перфторуглеродная эмульсия - ПЕРФУЗОЛЬ

COMPONENTS - СОСТАВ :

PFMCP	- перфторметилциклогексимиоперидин (M _n - 595Д)	10г
Pluronic	- проксанол 168 (M _n - 5700Д, ПОПР < 20%)	3г
HES	- оксиэтилкрахмал (M _n - 80гД)	3г
NaCl *	- натрия хлорид	0,8г
KCl	- калия хлорид	0,039г
MgCl ₂	- магния хлорид	0,019г
CaCl ₂	- кальция хлорид	0,028г
NaH ₂ PO ₄	- натрия гидрофосфат	0,02г
NaHCO ₃	- натрия гидрокарбонат	0,13г
Glucose	- глюкоза	0,2г
H ₂ O	- вода для инъекции	до 100мл

PROPERTY - СВОЙСТВА :

F ⁻	- содержание ионов фтора	< 10 ⁻⁵ М
Av.diameter	- средний размер частиц	0,07-0,11мкм
Onc.pressure	- онкотическое давление	360-380мм вод.ст.
Osmolarite	- осмотичность	340-360мОсм
Viscosity	- вязкость	2,5сП
pH		7,4-7,6
Vol. %O ₂	- растворимость O ₂ (pO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	~ 7,0об%
Vol. %CO ₂	- растворимость CO ₂ (pCO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	~ 80об%

* состав солевой композиции может изменяться и дополняться

III. В 1984 году Фармакологический комитет Минздрава дал разрешение на клиническую апробацию плазмозаменителя с газотранспортной функцией Перфторана, который был создан в 1982 году под руководством профессора Ф. Ф. Белоярцева (табл. 3). По ряду причин испытания препарата были прерваны и вновь возобновлены в 1992г. Показания к изучению Перфторана в качестве плазмозаменителя с функцией переноса O_2 и CO_2 как противошокового, противоишемического и кардиопротекторного средства при:

- острой и хронической гиповолемии (травматическом, геморрагическом, ожоговом и инфекционно-токсическом шоке, черепно-мозговой травме, операционной и послеоперационной гиповолемии);
- нарушении микроциркуляции и периферического кровообращения, изменении тканевого метаболизма и газообмена (гноино-септическом состоянии, инфекции, нарушении мозгового кровообращения, жировой эмболии);
- противоишемической защите донорских органов (предварительная подготовка донора и реципиента);
- кардиоплегии (использование в аппарате искусственного кровообращения);
- регионарном и местном применении (регионарной перфузии, лаваже легких, промывании гнойных ран, брюшной и других полостей).

Препарат Перфторан не обладает:

- канцерогенностью
- мутагенностью
- иммуномодуляцией
- эмбриотоксичностью (в дозе 10мл/кг при ежедневном введении в течение 11 дней)

Перфторан хранится при $+4^{\circ}C$ - 2 недели, при $18^{\circ}C$ - 1 год (рис. 3, 4). Многократная разморозка (табл. 4, 5) существенно не изменяет средний размер частиц эмульсии, который измерялся с помощью фотоэлектрического колориметра, без определения наличия несвязанного перфторуглерода.

Таблица 3.

"ARTIFICIAL BLOOD" - PERFTORAN
"Искусственная кровь" - Перфторан

COMPONENTS - СОСТАВ :

PFMCP	- перфторметилциклогексилпиперидин (M_w -595 Д)	6,5г
PFD	- перфтордекалин (M_w - 462 Д)	13г
Pluronic	- проксанол (M_w - 8000 Д, ПОПР < 20%)	4г
NaCl	- натрия хлорид	0,6г
KCl	- калия хлорид	0,039г
MgCl ₂	- магния хлорид	0,019г
NaH ₂ PO ₄	- натрия гидрофосфат	0,02г
NaHCO ₃	- натрия гидрокарбонат	0,13г
Glucose	- глюкоза	0,2г
H ₂ O	- вода для инъекции	до 100мл

PROPERTY - СВОЙСТВА :

F ⁻	- содержание ионов фтора	< $10^{-5}M$
Av.diameter	- средний размер частиц	0,07-0,15мкм
Osmolarity	- осмотичность	340мОсм
Viscosity	- вязкость	2,5сП
pH	-	7,4 - 7,6
Vol.%O ₂	- растворимость O ₂ (pO ₂ - 760мм рт.ст., t - 20°C)	~ 7,0об%
Vol.%CO ₂	- растворимость CO ₂ (pCO ₂ - 760мм рт.ст., t - 20°C)	~ 60об%

Таблица 4.

Зависимость среднего размера частиц (нм) эмульсии Перфторан от многократной разморозки/заморозки (-18°C)

N партии	Количество разморозов/заморозов (-18°C)							
	исх.	1	2	3	4	5	6	7
71	0,07	0,078	0,084	0,085	0,090	0,090	0,089	0,090
72	0,07	0,072	0,071	0,078	0,081	0,083	0,084	0,085
73	0,07	0,073	0,075	0,081	0,083	0,085	0,086	0,087

Таблица 5.

Изменение среднего размера (нм) частиц эмульсии Перфторан во время хранения при -18°C.

N парт.	Время хранения (дни)				
	исх.	7	14	21	28
эм. N40	0,063	0,064	0,065	0,067	0,065
эм. N41	0,056	0,069	0,069	0,067	0,067
эм. N71	0,07	0,075	0,072	0,085	0,085

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что эмульсия Перфторан является более монодисперсной, чем аналогичные зарубежные препараты (табл. 6). Так, содержание частиц с диаметром до 0,1 мкм в Перфторане составляет 86,5%, тогда как во Флюозоле-ДК и Флюозоле-43, соответственно 53% и 65%. Как уже было сказано, острая токсичность зависит от фракции частиц размером более 0,4 мкм. В Перфторане вообще отсутствует фракция частиц даже с диаметром 0,3 мкм, тогда как у

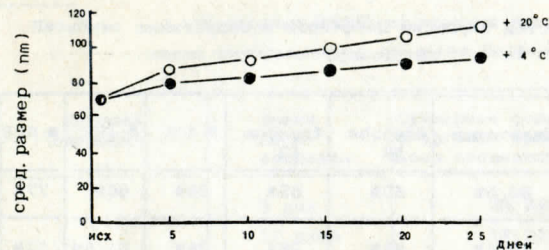


Рис. 3. Изменение среднего размера частиц (нм) эмульсии Перфторан во время хранения при +4°C и +20°C

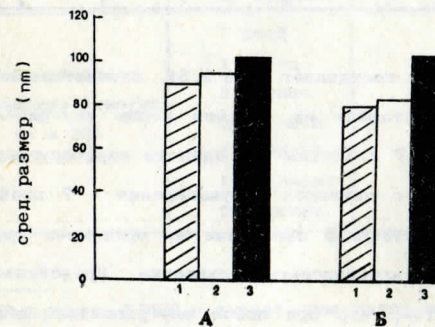


Рис. 4. Изменение среднего размера частиц (нм) эмульсии Перфторана во время хранения при -18°C в течение 2 лет (эмульсии А и Б)
1 - исход, 2 - через 1 год, 3 - через 2 года

Таблица 6.

Распределение частиц эмульсии Перфторан и зарубежных эмульсий по размеру

диаметр частиц (мкм)	Перфторан	Флюоздл ДК	Флюозол 43	Ф-44Е	Ф-46Е	Ф-66Е
менее 0,1	86,5%	53%	65%	56%	66%	77%
0,1 - 0,2	12,6%	26%	26%	28%	31,5%	22%
0,2 - 0,3	0,9%	13%	6,5%	14%	2,5%	1%
более 0,3	-	8%	2,5%	2%	-	-
ср. значение	0,07	0,096	0,086	0,09	0,08	0,06

зарубежных аналогов последняя составляет 8% и 2,5%, соответственно.

Выведение эмульсии Перфторана из органов после внутривенного введения представлены в табл. 7 и 8. Так как один из перфторуглеродов Перфторана - перфтордекалин с периодом полувыведения - 7 дней, то основной интерес будет представлять выведение из организма другого перфторуглерода - перфторметилциклогексилпиперидина. Представленные данные свидетельствуют о том, что при любом внутривенном введении эмульсии Перфторан - и плеторически (10мл/кг), и при кровезамещении (50-60%), полное выведение перфторметилциклогексилпиперидина из организма составляет 18-24 месяца. Представляют интерес данные о выведении перфторуглеродов и проксанола из кровеносного русла и саркоплазматических мембран кардиомиоцитов. Последний фактор, возможно, определяет мембранотропные эффекты эмульсии Перфторан (табл. 9).

Таблица 7.

Выведение ПФМЦП из органов крыс после внутривенного введения Перфторана

Условия введения	Время после введения	Суммарное содержание ПФМЦП в органах крыс в % от общей дозы введенного ПФОС
Кровезамещение 50-60% (n = 32)	3 дня	33,2±1,92
	14 дней	18,1±1,99
	1 месяц	11,5±1,74
	2 месяца	9,5±0,32
	6 месяцев	2,9±0,21
	8 месяцев	2,1
	13 месяцев	1,25
Плеторическое введение 10мл/кг (n = 25)	18 месяцев	0,5
	24 месяца	следы
	7 дней	18,8
	1 месяц	10,0
	3 месяца	5,4
	6 месяцев	2,4
	12 месяцев	1,1
18 месяцев	0,85	
24 месяца	следы	

Таблица 8.

Содержание ПФМЦП в тканях крыс после частичной замены крови (50-60%) эмульсией "Перфторан" (доза 35-43мл/кг) (n = 20)

Органы	мг/г ткани					
	14дн	1мес	6мес	13мес	18мес	24мес
печень	6,7	3,42	1,22	0,14	след	не обнар
селезенка	1,4	6,4	3,9	0,14	след	не обнар
костный мозг	9,8	след*	след	не обнар	не обнар	не обнар
лимфоузлы	не обнар	0,48	след	не обнар	не обнар	не обнар

* следовые количества - менее 0,05мг/г ткани

Таблица 9.

Выведение перфтордекалина/перфторметилциклогексилпиперидина и проксанола из кровеносного русла и саркоплазматических мембран кардиомиоцитов кролика ($n = 3$) в % от общей дозы введенного ПФОС и ПАВ в составе эмульсии Перфторан, полученные анализом интегральной интенсивности ^{19}F -ЯМР спектров и спектрофотометрически.

Условия введения	Время после введения (час)	Суммарное содержание ПФОС в крови (%)	Содержание проксанола в крови (%)	Содержание ПФОС в мембранах (мкг/мг белка)
Плеторическое введение в дозе 20мл/кг	исход	100	100	-
	1	95	20	2,1
	2	-	1,5	-
	4	-	1,0	-
	6	-	0,5	4,1
	12	70	0,3	6,0
	24	50*	0,3	10,5
	72	20	не обнар.	5,2

* значение, близкое к периоду полувыведения

Таблица 10.

Физико-химические и биологические свойства поверхностно-активных веществ (ПАВ)

ПАВ	Мол. масса (Д)	Содержан. реакц. гр. (М/М)	Содержан. гидрофобного блока/ПОПР/ (%)	ЛД ₅₀ мыши (г/кг)
F-168/38/ (Russian)	5700	0,24	19,0	24,0
F-268/35/ (Russian)	7200	0,48	19,5	15,0
F-268/1/ (Russian)	8000	0,20	19,0	14,2
F-68 (Serva)	8300	0,20	21,0	9,4

В качестве стабилизаторов эмульсий использовались поверхностно-активные вещества - блок-сополимеры окиси этилена и пропилена с различной молекулярной массой - проксанола. Согласно собственным и литературным данным, эмульсии, стабилизированные проксанолом, имеют многие положительные свойства, которыми обладает проксанол:

- снижение вязкости крови за счет влияния проксанола на форменные элементы крови;
- уменьшение агрегации эритроцитов, способствующее лучшей микроциркуляции;
- увеличение резистентности эритроцитов к осмотическому и кислотному гемолизу;

- уменьшение коронарно-сосудистого сопротивления;
- улучшение сердечного выброса;
- воздействие на кровоток в магистральных сосудах, снижение в них сопротивления;
- увеличение заряда на поверхности клеточных мембран.

Главным недостатком эмульсий, стабилизированных проксанолом, являются побочные реакции или реактогенность, которая обусловлена, как принято считать, активацией системы комплемента и связана с поверхностно-активным веществом - проксанолом или плуроником. Заменяв эмульгатор (плуроник F-68) на фосфолипиды, являющиеся, как известно, хорошими стабилизаторами перфторуглеродных эмульсий, зарубежные авторы во многом уменьшили проблему реактогенности. Но при этом, получили препарат, лишенный ряда положительных свойств, характерных для проксанольных эмульсий.

Снижение реактогенности проксанольных эмульсий типа Перфторан было осуществлено с помощью создания новой технологии изготовления эмульсий (табл. 11).

Степень реактогенности (данный метод любезно предоставлен Ленинградским НИИГиПК) исследовалась по косвенному методу оценки функциональной активности C5a - анафилатоксина по нейтропенической реакции. Это связано с тем, что внутрисосудистая активация комплемента сопровождается перераспределительной реакцией нейтрофилов, заключающейся в мгновенном, но кратковременном исчезновении их из кровеносного русла и сполнении в сосудах легких.

Экспериментальным путем установлено, что максимальное значение нейтропенического индекса не должно превышать 2 усл. ед. Чем ниже индекс, тем меньшей реактогенностью обладают перфторуглеродные эмульсии, стабилизированные проксанолом. В таблице 12 представлены перфторуглеродные эмульсии типа Перфторан, нейтропенический индекс

которых составляет в среднем 1,57 и 1,67 усл. ед., соответственно, через 5 и 20 минут после внутривенного введения в организм животных.

Исследования показали, что отдельно взятый раствор проксанола не обладает реактогенными свойствами также, как специально обработанный с помощью дезинтегратора под высоким давлением. Супернатант, полученный при 30000 оборот/мин. в течение 40 мин. из заведомо реактогенной эмульсии также не вызывал активацию системы комплемента (табл. 11). Поэтому можно было предположить, что в эмульсии происходят некоторые физико-химические сдвиги на другом уровне, по-видимому, отвечающем за активацию системы комплемента. Для выявления этого эффекта был использован метод ядерно-магнитного резонанса. Экспериментальным путем установлено (рис. 5), что спектр реактогенной эмульсии имеет сигнал по группе CH_3 , существенно отличающийся от спектра этой же группы в ареактогенной эмульсии. В реактогенной эмульсии сигнал характеризуется появлением "тяжелой" фракции - широкой компоненты и уменьшением амплитуды сигнала CH_3 . Следует отметить, что появление широкой компоненты наблюдается и в ареактогенной эмульсии, но она значительно меньше по отношению к амплитуде узкой компоненты. По мере хранения реактогенной эмульсии в незамороженном виде спектр ^1H -ЯМР существенно изменяется, при этом соответственно уменьшается и величина нейтропенического индекса (рис. 5).

Из полученных данных можно заключить, что уменьшение активации системы комплемента, по-видимому, во многом определяется правильно выбранным режимом гомогенизации перфторуглеродов, что подтверждается спектральным анализом полученных эмульсий.

Таблица 11.

Величина активации системы комплемента (по нейтропеническому индексу) в зависимости от давления при получении перфторуглеродных эмульсий типа Перфторан с помощью гомогенизации

Составы	Давление (усл. ед.)	Т С ⁰ (ус. ед)	нейтропенический индекс (усл. ед)	
			через 5 мин.	через 20 мин.
Солевой р-р	-	-	1,27	1,42
Полиглюкин	-	-	1,28	1,44
Проксанол I 4%	-	-	1,33	1,21
Проксанол II 4%	12,3	14,0	1,62	1,20
Супернатант эмульсии I	-	-	1,26	1,42
Эмульсия I	12,3	14,0	14,1	11,0
Эмульсия II	7,8	12,0	12,2	8,70
Эмульсия III	7,8-12,3	12-14	1,66	4,47
Эмульсия IV	3,3-12,3	9-14	1,20	4,89
Эмульсия V	3,3-7,80	7-9	1,57	1,67

Таблица 12.

Изменение количества нейтрофилов ($\times 10^9/\text{л}$) и нейтропенического индекса (усл. ед.) - косвенного показателя активации системы комплемента в периферической крови кроликов через 5 и 20 минут после введения Перфторана, приготовленного при давлении от 3,3 до 7,80 усл. ед.

Эмульсии N	Исход нейтроф.*	через 5 мин.		через 20 мин.	
		нейтрофилы*	индекс	нейтрофилы*	индекс
V-1	2842	4149	0,96	1809	2,19
V-2	5628	6663	1,20	3740	2,12
V-3	2782	2630	1,44	3150	1,25
V-4	2345	1614	2,30	3811	0,79
V-5	2075	1922	1,51	1380	2,09
V-6	1426	1888	1,60	1833	1,60
V-7	3560	3016	1,65	2997	1,67
V-8	1564	1063	2,06	1484	1,47
V-9	1782	1317	1,89	1654	1,51
среднее значение индекса			1,57	-	1,67

* средние данные по трем животным

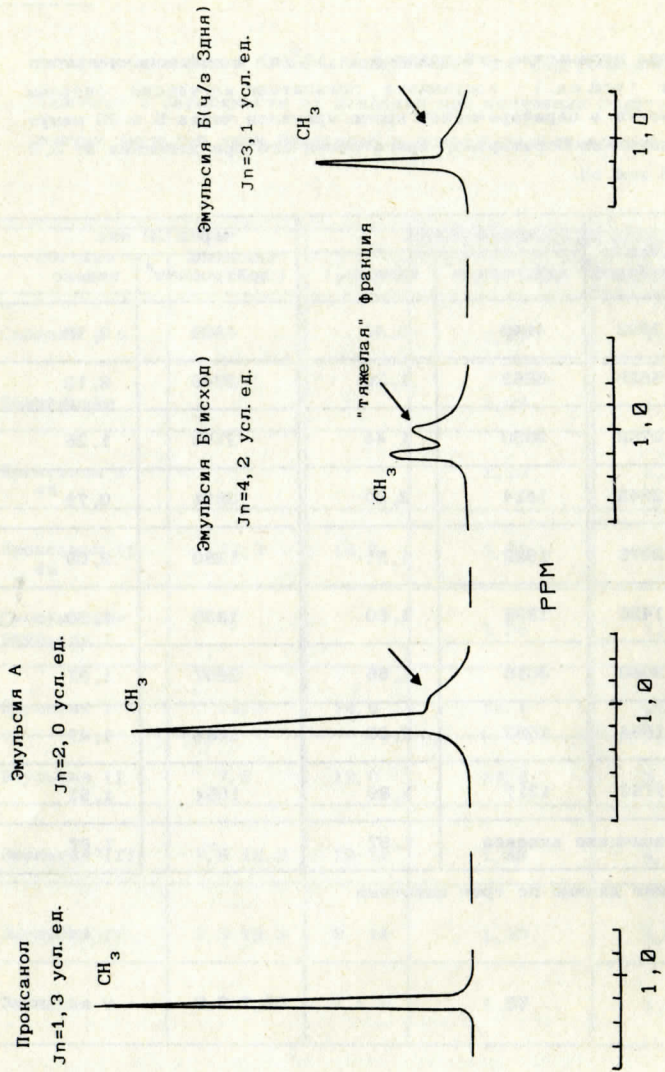


Рис. 5. Спектральный анализ эмульсии и проксанола

IV. Следующий этап - создание рентгеноконтрастных сред для диагностики на основе перфторсоединений II поколения: перфторонтилбромид/перфторметилциклогексилпиперидин (2/1) завершился разработкой эмульсии "ВИММ-РК" (табл. 13).

Эмульсии на основе только одного ПФОБ - рентгеноконтрастном соединении, стабилизируют фосфолипидами яичного желтка, поскольку проксанол оказался для данного соединения малоэффективным эмульгатором. Вместе с тем гемореологические свойства фосфолипидных эмульсий менее выражены, чем эмульсий на проксаноле.

В новом варианте создания проксанольной эмульсии на основе перфторонтилбромида для увеличения стабильности использовался другой перфторуглерод - перфторметилциклогексилпиперидин в качестве дополнения в соотношении 2/1. Полученная таким способом перфторуглеродная эмульсия на проксаноле обладает: достаточной стабильностью как при гипотермии, так и при нормотермии (табл. 14), способностью существенно не изменять средний размер частиц эмульсии при многократной разморозке (табл. 15), относительно однородным составом частиц эмульсии (табл. 16), безвредностью (табл. 17), периодом полувыведения из кровеносного русла около суток при плеторическом введении в дозе 20 мл/кг (табл. 18), газотранспортными способностями (рис. 1), гемореологическими эффектами, свойственными проксанольным эмульсиям, рентгеноконтрастными свойствами (рис. 7) даже при концентрации ПФОС - 10 об% и разведении ПФОБ : ПФМЦП - 2 : 1 (табл. 13)

Таблица 13.

Contrast perflubrom emulsion - "ВИММ-РК"

Контрастирующая перфтороктилбромидная эмульсия - "ВИММ-РК"

COMPONENTS - СОСТАВ :

PFOB	- перфтороктилбромид (M _w - 499 Д)	13,0г
PFМЦР	- перфторметилциклогексилпиперидин (M _w - 595 Д)	6,5г
Pluronic	- проксанол (M _w - 8000 Д, ПОПР < 20%)	4г
NaCl	- натрия хлорид	0,6г
KCl	- калия хлорид	0,039г
MgCl ₂	- магния хлорид	0,019г
NaH ₂ PO ₄	- натрия гидрофосфат	0,02г
NaHCO ₃	- натрия гидрокарбонат	0,13г
Glucose	- глюкоза	0,2г
H ₂ O	- вода для инъекции	до 100мл

PROPERTY - СВОЙСТВА :

F ⁻	- содержание ионов фтора	< 10 ⁻⁵ М
Av. diameter	- средний размер частиц	0,07-0,15мкм
Osmolarity	- осмотичность	340мОсм
Viscosity	- вязкость	2,5сП
pH	-	7,4 - 7,6
Vol.%O ₂	- растворимость O ₂ (рO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	~ 7,0об% ~ 80об%
Vol.%CO ₂	- растворимость CO ₂ (рCO ₂ - 760мм рт.ст., t -20°C)	

Для сравнения рентгеноконтрастных свойств эмульсии ВИММ-РК использовался 76% Триомбрас (синонимы: верографин, урографин, уротраст) - препарат, широко применяемый в клинике для диагностики: ангиокардиографии, артериографии, ангиографии, флебографии и др., путем внутрисосудистого введения. Несмотря на большое количество побочных реакций (анафилактикоидная реакция и анафилактический шок, артериальная гипотония и коллаптоидное состояние, отек легких и остановка сердца), Триомбрас продолжает применяться из-за отсутствия альтернативных вариантов.

По своим рентгеноконтрастным свойствам эмульсия ВИММ-РК незначительно уступает 76% Триомбрасу (рис. 7), но несомненным преимуществом её является отсутствие выше названных побочных эффектов. При этом существенное значение имеет время циркуляции препарата в крови для проведения повторных рентгенографических исследований. Так Триомбрас из организма очень быстро выводится почками, а период полувыведения эмульсии ВИММ-РК - около 24 часов.

Таблица 14.

Изменение среднего размера (мкм) частиц эмульсии ВИММ-РК во время хранения при температуре +4°C и +20°C

t °C хранения	Время хранения (дни)							
	исход	1	2	3	4	5	6	7
+4 °C	0,076	0,077	0,076	0,076	0,080	0,086	0,092	0,096
+20 °C	0,076	0,080	0,082	0,085	0,094	0,094	0,110	0,114

Таблица 15.

Изменение среднего размера (мкм) частиц эмульсии ВИММ-РК при многократной разморозке и заморозке (-18°C)

Показатель	Количество разморозок/заморозок (-18°C)							
	исход	1	2	3	4	5	6	7
средний размер частиц (мкм)	0,076	0,080	0,082	0,083	0,083	0,087	0,090	0,097
	0,076	0,079	0,081	0,083	0,085	0,088	0,089	0,098

Таблица 16.

Распределение частиц эмульсии ВИММ-РК и Перфторан (метод негативного контрастирования)

Эмульсии	Диаметр частиц (мкм)			
	менее 0,1	0,1-0,2	0,2-0,3	более 0,3
ВИММ-РК	77%	22%	1,0%	не обнаруж.
Перфторан	86,5%	12,6%	0,9%	не обнаруж.

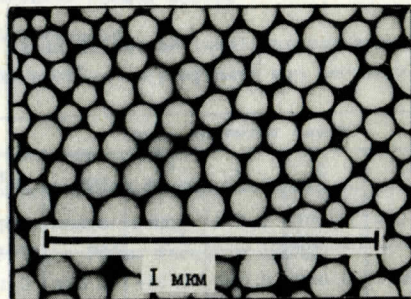


Рис. 6. Электроннограмма эмульсии Перфторан, полученная методом негативного контрастирования

Таблица 17.

Острая токсичность эмульсии ВИММ-РК при внутрибрюшинном введении мышам

Кол-во мышей в группе	Доза (мл/мышь)	Время наблюдения (дни)							Реакции
		2	4	6	8	10	12	14	
n=10	0,6	10	10	10	10	10	10	10	нет
n=10	0,8	10	10	10	10	10	10	10	нет
n=10	1,0	10	10	10	10	10	10	10	нет

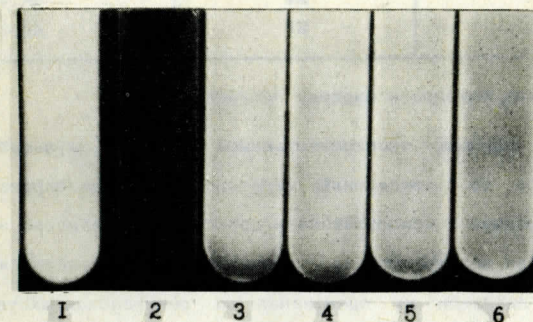


Рис. 7. Рентгеноконтрастные свойства 10 об% эмульсии ВИММ-РК и её смеси с плазмой:

- 1- контроль - рентгеноконтрастное вещество - 76% Триомбраст
- 2- контроль - плазма
- 3- ВИММ-РК - эмульсия 10 об%
- 4- ВИММ-РК / плазма (соотношение 3:1)
- 5- ВИММ-РК / плазма (соотношение 1:1)
- 6- ВИММ-РК / плазма (соотношение 1:3)

Таблица 18.

Выведение перфтороктилбромида/перфторметилциклогексилпиперидина из кровеносного русла кроликов ($n = 3$) в % от общей дозы введенного ПФОС в составе эмульсии ВИММ-РК, полученные анализом интегральной интенсивности ^{19}F -ЯМР спектров.

Условие введения	Время после введения (час)	Суммарное содержание ПФОС (%)
Плеторическое введение в дозе 20 мг/кг	1	97,1
	3	93,7
	6	86,6
	9	81,0
	21	62,0
	24	54,0 *
	27	44,2

* значение, близкое к периоду полувыведения

Таким образом, экспериментальное изучение эмульсий ВИММ-РК на основе смеси из 2 соединений: перфтороктилбромида/перфторметилциклогексилпиперидина с использованием проксанола в качестве эмульгатора и уменьшение их реактогенности за счет изменения технологии, позволило увеличить диапазон их применения от рентгеноконтрастных сред до плазмозамещающих препаратов с газотранспортной функцией.

В представленном информационном материале тезисно суммированы некоторые направления деятельности в области создания проксанольных эмульсий на основе перфторорганических соединений в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН и фармацевтической фирме "Перфторан". Авторы не претендуют, в связи с ограниченностью объема, на полноту изложения материала и благодарят всех коллег за оказанную помощь.