

Карагандинский государственный медицинский университет

УДК 616.381-008.718

На правах рукописи

ЮСИФОВ ЗАМИГ АЛИЗАМИН ОГЛЫ

**Фармакокинетические аспекты направленного транспорта антибиотиков
в очаг хирургической инфекции с помощью клеточных носителей
(Экспериментальное исследование)**

6D110100 - Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Лохвицкий Сергей Викторович

научный консультанты:
доктор медицинских наук, профессор
Гуляев Александр Евгеньевич
MD, доктор PhD
Альбертон Иосиф Натанович

Республика Казахстан
Караганда, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
1.1 Обзор литературы.....	10
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.1 Материал исследования.....	21
2.2 Создание лейкоцитарной транспортной системы для антибиотика цефтриаксон.....	21
2.3 Создание эритроцитарной транспортной системы для антибиотика цефтриаксон.....	22
2.4 Методика биофармацевтического исследования.....	24
2.5 Исследование фармакокинетики антибиотика цефтриаксон в составе клеточных транспортных систем после однократного внутривенного введения интактным (здоровым) кроликам.....	26
2.6 Исследование фармакокинетики антибиотика цефтриаксон в составе клеточных транспортных систем после однократного внутривенного введения кроликам с моделью очаговой гнойной хирургической инфекции	27
2.7 Фармакокинетическое моделирование	30
2.8 Статистический анализ.....	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
3.1 Результаты биофармацевтического исследования лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных систем для антибиотика цефтриаксон.....	33
3.2 Фармакокинетика антибиотика цефтриаксон в составе лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы при однократном внутривенном введении интактным кроликам.....	35
3.3 Фармакокинетика антибиотика цефтриаксон в составе лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы при однократном внутривенном введении кроликам с моделью очаговой гнойной хирургической инфекции.....	42
3.4 Сравнение показателей фармакокинетики цефтриаксона у интактных кроликов и кроликов с моделью очаговой хирургической инфекции.....	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	63
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	64

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;
ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Фармакокинетика — раздел клинической фармакологии, предметом которого является изучение процессов всасывания, распределения, связывания с белками, биотрансформации и выведения лекарственных веществ.

Камера — условное понятие в фармакокинетике, под которым понимают пространство, характеризующееся определенным объемом и концентрацией медикамента в этом пространстве.

Концентрация лекарства (C) — количество препарата в определенном объеме крови в конкретный момент после введения лекарства в организм.

Объем распределения (V) — (кажущийся, гипотетический объем распределения препарата) — условный объем жидкости, необходимый для равномерного распределения (растворения) введенной дозы лекарства до концентрации, обнаруживаемой в крови в момент исследования; что выражается в мл, л на г, кг массы тела.

Площадь под кинетической кривой концентрация-время (area under curve, AUC). AUC при линейной кинетической кривой (линейная зависимость) пропорциональна количеству медикамента, находящемуся в системном кровотоке.

Общий клиренс (Cl) — условный объем плазмы или крови, освобождающийся ("очищающийся") от лекарственного средства за единицу времени; выражается в объемных единицах (л/мин, мл/мин).

Период полувыведения ($T_{1/2}$) — время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации препарата в крови, зависит от константы скорости элиминации ($T_{1/2} = 0,693/K_{el}$).

Период полуабсорбции ($T_{1/2,a}$) — время, необходимое для всасывания половины дозы препарата из места введения в кровь, пропорционален константе скорости абсорбции ($T_{1/2,a} = 0,693/K_a$).

Константа элиминации ($K_{эл}$) — процент снижения концентрации лекарства в крови в единицу времени.

Кажущаяся начальная концентрация (C_0), которая была бы достигнута в плазме крови при их внутривенном введении и мгновенном распределении в органах и тканях.

Равновесная концентрация (C_{ss}), устанавливаемая в плазме (сыворотке) крови при их поступлении в организм с постоянной скоростью (при прерывистом введении (приёме) через одинаковые промежутки времени в одинаковых дозах выделяют максимальную (C_{ssmax}) и минимальную (C_{ssmin}) равновесные концентрации).

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

$T_{1/2}$ – фармакокинетический параметр, обозначающий период полувыведения.

AUC - фармакокинетический параметр, обозначающий площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время».

Кэл - фармакокинетический параметр, обозначающий константу элиминации.

$T_{1/2,a}$ - фармакокинетический параметр, обозначающий период полувсасывания.

Cl - фармакокинетический параметр, обозначающий тотальный клиренс

MRT - фармакокинетический параметр, обозначающий среднее время удержания.

F - фармакокинетический параметр, характеризующий переход препарата из центральной камеры модели в периферическую камеру.

C – концентрация.

t - время.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Идея селективного, избирательного распределения лекарственных средств в организме человека, очевидно, была актуальна всегда, но приблизиться к её разрешению удалось лишь в настоящее время благодаря разработке и внедрению в клиническую практику методологии направленного транспорта. В современной фармакологии довольно отчётливо проявляется тенденция создания методов направленной («адресной») доставки лекарственных средств и разработка транспортных систем, призванных обеспечить целенаправленную доставку к мишени, контролируемое высвобождение, получение пролонгированного эффекта, повышение терапевтической эффективности препарата, а также снижение его токсичности [1, 2]. Ключевую роль в решении этих задач играют собственно транспортёры лекарственных средств. Они позволяют не только создать депонированную форму введённого соединения, но и защитить лекарство от преждевременного разрушения и инактивации ретикулоэндотелиальной системой организма; предотвратить или уменьшить иммунные и аллергические реакции организма на введённый препарат; осуществлять его направленную доставку в органы и ткани-мишени [3-5]. В качестве микроконтейнеров, осуществляющих доставку лекарственных средств к мишеням могут выступать и аутологичные клетки крови. Идеи использования клеток крови с целью создания систем направленного транспорта лекарственных средств, безусловно, логически обоснованы и кажутся наиболее простым, доступным для клиники вариантом решения данной проблемы. Реализация идеи направленного транспорта лекарств идёт по линии использования эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов в качестве контейнеров для доставки лекарственных средств [6, 7]. Более распространена идея использования в качестве транспортеров для лекарств эритроциты крови. Они легко могут быть выделены из крови, где присутствуют в больших количествах, обладают достаточно длительным временем жизни и, по мере старения, подвергаются в организме естественному процессу биodeградации [8, 9]. Клеточные контейнеры для лекарственных средств, созданные на основе аутологичных эритроцитов, получили название «фармакоциты» [10-12]. Менее разработанной транспортной системой для антибиотиков является клеточная лейкоцитарная система, создаваемая на основе отечественных разработок [13]. Однако, перспективность такой транспортной системы, вероятность получения значительного терапевтического эффекта обсуждается в литературе в последнее время особенно интенсивно для противомикробных и противоопухолевых препаратов [14, 15].

Гипотетически клеточные транспортные системы должны менять фармакокинетические свойства для инкапсулированного лекарственного вещества и обеспечивать селективное распределение лекарственного средства с преимущественным накоплением в тканях ретикуло-эндотелиальной системы (RES) или в местах скопления клеток, способных к фагоцитозу (абсцессах, гнойных очагах и т.д.) [16, 17].

Предполагается, что высвобождение лекарственного вещества из клеточной транспортной системы должно происходить при разрушении во время эндоцитоза/фагоцитоза [18].

Тем самым, создаётся вероятность повышения концентрации антибиотика в зоне скопления фагоцитирующих клеток, например, в зоне гнойно – воспалительного очага [19]. Эти предположения обращают особое внимание на антибиотики в качестве объектов для включения в клеточные транспортные системы. Однако, разработка стратегий использования транспортных систем для антибиотиков на основе аутологичных клеток крови ограничивается недостаточной степенью описания особенностей фармакокинетики и невозможностью вследствие этого прогнозировать дозовый режим. Отсутствие надлежащего объёма доклинических результатов препятствует внедрению идей направленного транспорта в клинику. Все вышеприведённые сведения можно считать аргументами, обосновывающими актуальность разработки новых лекарственных транспортных форм антибиотиков на основе аутологичных клеток крови.

Цель исследования

Определение перспективности систем направленного транспорта антибиотиков на основе аутологичных клеток крови по фармакокинетическим параметрам.

Задачи исследования

1. Получение контейнеров (транспортных систем) для антибиотиков на основе аутологичных клеток крови, их биофармацевтическая характеристика *in vitro*.
2. Исследование фармакокинетики модельного антибиотика – цефтриаксона, включённого в аутологичные клетки крови, при однократном внутривенном введении интактным кроликам.
3. Исследование фармакокинетики модельного антибиотика – цефтриаксона, включённого в аутологичные клетки крови, при однократном внутривенном введении кроликам с моделью очаговой хирургической инфекции.
4. Сравнение фармакокинетических параметров модельного антибиотика, включённого в аутологичные клетки крови, выбор оптимального варианта.

Научная новизна

1. Проведено сравнение фармакокинетики двух основных систем направленного транспорта антибиотиков на основе аутологичных клеток крови – лейкоцитарной транспортной системы и системы направленного транспорта на основе эритроцитарных теней, установлено преимущество лейкоцитарной транспортной системы по параметрам периода полувыведения ($T_{1/2}$) и площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (AUC).
2. Доказана возможность повышения уровня концентрации антибиотика в очаге бактериального гнойного воспаления при введении антибиотика в составе лейкоцитарной транспортной системы.
3. Результатами фармакокинетического эксперимента доказано ранее существовавшее предположение, что при включении антибиотика в клеточные

транспортные системы на основе аутологичных клеток крови фармакокинетика меняется однотипно.

Основные положения, выносимые на защиту

1. *In vitro* тени эритроцитов и лейкоцитарная масса клеток крови способны обратимо связывать из внеклеточной среды внесённый антибиотик цефтриаксон и постепенно высвобождать большую часть его в течение суток. Такой тип взаимодействия можно обозначить как депонирование антибиотика, а образующийся комплекс антибиотика и аутологичных клеток крови, как транспортную клеточную систему.

2. Эритроцитарная и лейкоцитарная транспортные системы вызывают однотипные изменения в фармакокинетике включённого в них антибиотика. Особенности фармакокинетике цефтриаксона при внутривенном введении в составе эритроцитарной транспортной системы либо в составе лейкоцитарной транспортной системы, по сравнению с внутривенным введением свободного антибиотика, являются увеличение периода полувыведения и кажущегося объёма распределения, снижение константы элиминации и клиренса цефтриаксона.

3. По фармакокинетическим параметрам лейкоцитарная транспортная система для антибиотиков может считаться более перспективной по сравнению с эритроцитарной клеточной транспортной системой.

Практическая значимость

Полученные в диссертационной работе данные относительно возможности направленных изменений фармакокинетике, свидетельствуют о перспективности разработки систем транспорта антибиотиков на основе аутологичных клеток крови (эритроцитов и, в большей степени, лейкоцитов). Параметры фармакокинетике антибиотика, депонированного в аутологичных клетках крови, установленные в работе, могут являться ориентиром при проведении клинических исследований систем направленной доставки антибиотиков.

Внедрение в практику

Данные методики планируются внедрить в практику в клинике профессора С.В. Лохвицкого; ТОО МФ Гиппократ; Областной клинической больнице г.Караганды.

Личный вклад автора

Диссертантом самостоятельно проведены экспериментальные исследования на 48 лабораторных животных (проведение лейкоцитарного, эритроцитарного транспорта, моделирование абсцесса мягких тканей на кроликах, определение концентрации антибиотика цефтриаксон в очаге хирургической инфекции, плазме крови)

Весь материал систематизирован, документирован и оформлен в виде диссертации лично автором.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены: в Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 80-летию профессора С.В. Лохвицкого (г.Караганда,

2015 г.); международной научно-практической конференции молодых учёных «Мир науки и молодёжь: новые пути развития» (г. Караганда, 2016 г.); 5 ежегодной международной научно-практической конференции «актуальные вопросы медицины» (г.Баку, 2016 г.); на заседании кафедры хирургических болезней № 2; на научно-экспертной комиссии хирургических дисциплин КГМУ.

Тема научно-исследовательской работы получила одобрение этического комитета КГМУ (протокол № 21 от 21.11.2014 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них: 3 в научных изданиях рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, 1 публикация в международном научном издании, входящий в информационную базу компании Scopus «GeorgianMedicalNews».

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 разделов основной части, заключения с выводами и практическими рекомендациями, списка использованных источников, представленного 146 источниками. Текст изложен на 74 страницах компьютерного набора, иллюстрирован 23 таблицами, 22 рисунками.

1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Обзор литературы

Реализация целенаправленного концентрирования лекарственного препарата исключительно или хотя бы преимущественно в зоне, охваченной патологическим процессом, позволяет резко снизить нежелательные реакции организма на медикаментозное воздействие, сократить терапевтическую дозу лекарства и кратность его введения [20, 21].

В связи с этим по эффективности и минимальной токсичности направленный транспорт фармакологических средств сравнивается с «точечным бомбовым ударом» [22].

Впервые о возможности адресной доставки лекарств заговорил в конце XIX в. великий немецкий бактериолог П. Эрлих, предложив термин «волшебная пуля», подразумевающий препарат, который избирательно находит в организме и убивает опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани [23]. С тех пор селективное воздействие фармакологических агентов на определённые клетки и ткани *insitu* остаётся предметом многочисленных исследований. Сегодня наука уже вплотную подошла к решению данной проблемы.

Для обеспечения направленности действия лекарств предлагают использование регионарного введения препаратов. В качестве примеров подобных методов можно указать: внутрисуставное введение гормональных препаратов при лечении ревматоидного артрита; введение цитостатиков непосредственно в сосуд, питающий опухоль; внутрикоронарное введение тромболитических ферментов при терапии, вызванного тромбозом инфаркта миокарда [24]. Применение регионарного введения лекарств в перечисленных случаях показало высокую эффективность. В то же время очевидно, что данный подход не может претендовать на универсальность, кроме того, его применение требует наличия достаточно сложной аппаратуры контроля.

Начиная с 90-х гг. XX в. изучается возможность создания систем доставки лекарств непосредственно к патологическому очагу путём связывания молекул лекарственного вещества и неких других молекул (векторов), обладающих тропностью к определённым клеткам (метод «мечения»), а также путём заключения молекул лекарства в «биоактивные» капсулы на основе полупроницаемых искусственных или естественных мембран (метод «упаковки») [25, 26].

Одним из первых способов, предложенных для достижения этой цели является разработка липосомальной формы лекарственных препаратов. Еще в середине 60-х годов английский учёные A.D.Bangham и R.W.Horne, выясняя роль фосфолипидов в свёртывании крови, изучали структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании фосфолипидов в избытке воды и найденные на электронных микрофотографиях слоистые частицы, удивительно похожие на мембранные структуры клетки, называли липосомами [27]. Свойства коллоидных растворов также изучались А.А. Антипов [28] и соавторами, эти авторы также пришли к выводу о возможности использования этих структур в

качестве транспортёров лекарственных препаратов. Известно, что липосомы являются нетоксичными и биodeградируемыми, их мембрана имеет возможность слияния с клеточной и обеспечивать доставку содержимого липосом в клетку [29]. Стало известно, что в липосомы могут включаться различные вещества, при этом низкомолекулярные водорастворимые препараты содержатся преимущественно во внутренней водной фазе, а высокомолекулярные липофильные - сорбируются на их внутренних поверхностях, в основном за счёт образования водородных связей с полярными группами липидов [30]. Вещество, заключённое в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных деструкции в биосредах. Ещё одно важное преимущество липосом как носителя - это постепенное высвобождение лекарственного препарата, что увеличивает его время действия [31].

Однако общая схема применения липосомального транспорта оказалась не оптимальна, ввиду сложности проникновения этих субстанций в ткани с серьезными нарушениями микроциркуляции. Это отмечали ряд исследователей, например М.Е.Рез-Лопез и соавторы. При исследовании липосомального доксорубина в онкологической химиотерапии [32], а позже при исследовании липосомальных наногелевых структур [33, 34]. Результаты изучения биodeградируемых микрокапсул - липосом, доставляющих ферменты, гормоны, вакцины и другие биологические препараты отражено в большом количестве исследований [35-38], в ряде случаев недостатки липосомальных контейнеров для лекарственных препаратов удалось преодолеть в ряде лекарственных препаратов в форме липосом доступен на фармацевтическом рынке [39, 40].

Более удачными оказались другие попытки использования экзогенных носителей - полимерных макромолекул [41] антибиотики инкубировали в коллоидной среде (полиглюкин, реополиглюкин) при комнатной температуре в течение 30 мин и затем переливали внутривенно капельно. Однако макробιοполимеры имеют ряд существенных недостатков. Один из них в том, что Купферовские клетки избирательно поглощают их и переполняются ими, что в свою очередь приводит к блокаде ретикулоэндотелиальной системы, препятствует доставке антибиотика к очагу воспаления [42].

Более успешным и интенсивно развивающимся направлением конструирования транспортных систем для лекарственных средств является разработка полимерных и иных наночастиц, обратимо связывающих лекарственное средство. Наночастицы к настоящему времени являются наиболее разработанной транспортной системой для лекарственных средств [43-46].

Вообще на начало 2017 года в базе PubMed по запросу «nanoparticles AND Drugs Delivery» доступно 15523 публикаций. Ввиду избыточности информации по данной проблеме, мы решили ограничиться обзором работ только по наночастицам, как носителям антибиотиков «nanoparticles AND antibiotics Delivery», в этом разделе присутствует 54 сообщения, анализ наиболее значимых работ для темы данной диссертации представлен ниже.

Так, сообщается, что наиболее часто для доставки антибиотиков пробуют использовать полимерные биodeградирующие и биосовместимые poly (lactic-coglycolicacid) (PLGA), poly (L-histidine) and poly (ethyleneglycol) (PEG) наночастицы [47, 48]. В обзоре Gao et al. [49] указано, что в отношении 68 антибактериальных препаратов были осуществлены попытки разработки транспортных систем на основе полимерных наночастиц. Среди противобактериальных субстанций, включаемых в наночастицы при исследовании *invitro*: ципрофлоксацин, тобромицин, ванкомицин, меропенем, рифампицин, метициллин [50-54]. Среди противобактериальных субстанций, включаемых в наночастицы при исследовании *invivo*: ампициллин, амоксициллин, моксифлоксацин, хлоргексидин [55-57]. Обобщая результаты исследований по транспортным системам в форме наночастиц для антибиотиков, S.Zaidi et al. [58] указывают, что ожидаемый терапевтический эффект может увеличиться до 4 раз, сокращение токсического эффекта вероятно более чем в 2 раза, пролонгация – в несколько раз. В целом наночастицы оцениваются практическими всеми исследователями как перспективное транспортное средство для антибиотиков.

Альтернативным направлением, сформировавшимся в результате исследования возможности транспортировки лекарственных средств к очагу повреждения, является разработка методов, основанных на использовании клеточных носителей, полученных из форменных элементов крови, покрытых или непокрытых соответствующими антителами к органу мишени [59]. Такими клетками являются аутологичные или донорские стволовые клетки, эритроциты, тромбоциты и лейкоциты. Методы, предполагающие использование аутоклеток крови для модификации их свойств с целью создания внутриклеточного депо препарата и осуществления направленного транспорта, объединяют под общим названием «экстракорпоральная фармакотерапия». Считают, что подобные системы доставки наиболее выгодны с точки зрения их биологической совместимости [60, 61]. Т.П. Генинг и соавторы считают, что их органоспецифичность, будет определяться в первую очередь следующими свойствами: способностью лейкоцитов мигрировать в очаг воспаления, эритроцитов - фиксироваться фагоцитирующими клетками, (в основном печени и селезёнки), тромбоцитов - адгезировать на повреждённых участках интимы сосуда [62].

Первым этапом реализации направленного транспорта лекарственных средств на аутологичных клетках крови было применение так называемых "теней эритроцитов", получаемых при помощи гипотонического гемолиза. Впервые эта методика была описана Г.П.Самохиным и реализована Л.Е. Сипливой, которые сообщили, что если внутримышечное введение аминогликозидных антибиотиков (гентамицина и амикацина) оказывает иммуносупрессивное действие на организм здоровых животных, то введение антибиотиков, заключённые в тени эритроцитов, наоборот, усиливают развитие иммунного ответа [63]. При обычном введении аминогликозидов они обнаруживаются в крови и моче в первые часы после применения. Выявление антибиотиков, введённых в тени эритроцитов, отсрочено во времени. При

введении аминогликозидов, заключённых в аллогенные эритроциты, антибиотики в биожидкостях не выявляются. Это свидетельствует о возможной модификации эритроцитарной мембраны при обработке аминогликозидами или об образовании необратимого комплекса «эритроцит-антибиотик», устойчивого к процессам десорбции антибиотиков, и работающего как цельная клетка, стимулирующего функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Авторы предполагают, что в основе иммуностимулирующего действия аминогликозидов, введённых на клеточных носителях является отсроченное появление антибиотиков в крови, тогда как высокие концентрации антибиотиков в крови в первые сутки приводят к нарушению формирования полноценного иммунного ответа [24, с.10].

В других публикациях авторы доказывают иммуностимулирующее действие фторхинолонов, иммобилизованных на эритроцитарных мембранах и включенных в строму эритроцита [64].

В процессе создания транспортных систем, основанных на использовании эритроцитов, очевидным лимитирующим звеном является процесс «загрузки» клеток лекарственным препаратом. Предложены и используются методы, основанные на эффектах Hypotonicpreswelling, Hypotonicdialysis, Hypotonicchemolysis [65]. Однако все используемые варианты не стандартизованы, количество включаемого в эритроциты вещества сильно варьирует. Выходом из этой ситуации может быть использование аппаратного метода загрузки эритроцитов лекарственными препаратами, реализованного компанией EryDel (Italy) (Delivering Therapies Through Erythrocytes) [66].

Разработкой эритроцитарного транспорта лекарственных препаратов занимались очень многие отечественные исследователи [67-70]. Т.П. Генинг, К.К. Мануйлов сообщают о применении с целью направленного транспорта гентамицина эритроцитарных контейнеров, отмечая существенные изменения распределения препарата по органам и тканям: накопление в печени, селезёнке, почках увеличивается соответственно в 1,7-3; 19-27; 1,5 раза в зависимости от способа приготовления эритроцитарных носителей [71, 72].

D.A. Lewis и H.O. Alpar изучали возможности использования препаратов, инкапсулированных в эритроцитах в терапевтических целях [73].

Ж.Ш. Жумадиловым и Р.В. Макаренковой исследовались показатели включения антибиотиков в эритроцитарные тени при гипоосмотическом гемолизе. Ими выявлена зависимость гемолиза от вида и дозы антибиотика. Наибольшей возможностью включения в эритроцитарные тени обладают антибиотики группы аминогликозидов (канамицин, гентамицин) [68, с.13]. В дальнейшем авторами обосновано применение направленного транспорта канамицина в тени эритроцитов в печень при гнойно-воспалительных заболеваниях желчных путей и оценена его эффективность в сравнении с традиционным внутривенным способом введения [74].

Е.А. Тайгуловым описано успешное применение направленного транспорта антибиотиков (цефамезин, канамицин, гентамицин) в эритроцитарных тенях у больных острым холециститом. Отмечено, что использование данной методики позволило в 100% случаев купировать

клинико-лабораторные проявления острого холецистита и тем самым предупредить развитие заболевания. При этом установлено, что НТ гентамицина в эритроцитарных телях создаёт в желчи концентрацию препарата, превышающую аналогичную при его внутривенном введении, канамицина – в 2,3-3 раза [75].

В целом, большинство исследователей констатируют, что эритроциты являются одной из наиболее перспективных систем доставки. Применение эритроцитов в качестве контейнеров для различных препаратов снижает токсичность, снижает риск побочных эффектов и патологических иммунных реакций против инкапсулированных агентов, а также повышает эффективность инкапсулированных препаратов. Основное достоинство эритроцитов как носителей - их универсальность для лекарственных средств и биопрепаратов [76].

Но, несмотря на указанные достоинства, осуществление направленной доставки антибиотиков в очаг микробного воспаления с помощью эритроцитов довольно проблематично или нерешаемо вообще на данном этапе технологий [77, 78], что связывают с отсутствием тропизма эритроцитов, как переносчиков к воспалительному сайту. Несколько иначе обстоит дело с лейкоцитами, как транспортёрами лекарств. Закономерно предполагать, что в качестве носителей наиболее обосновано использование клеток белой крови, учитывая их способность быстро накапливаться в очаге острого воспаления. Однако при этом возникает задача создания комплекса "препарат - носитель", обеспечивающего связывание антибиотиков клетками.

Идея направленного транспорта антибактериальных химиопрепаратов непосредственно в очаг инфекции была первоначально высказана в 1992 г. С.В. Лохвицким и соавторами, которые впервые осуществили попытку использовать в качестве носителя лейкоциты, принимая во внимание их способность быстро и в больших количествах накапливаться в области воспалительного процесса [79, 80]. В это же время были получены доказательства того, что при эндолимфатическом введении клетки, присутствующие в лимфатических узлах и становятся контейнерами для переноса антибиотика в очаг гнойного воспаления. Лейкоцитарный транспорт антибиотиков и обеспечивал накопление препаратов в очаге гнойного воспаления. Относительная техническая «непростота» метода эндолимфатического введения путём катетеризации лимфатического сосуда существенно лимитировала распространение такового в качестве стандартного, но и более простые варианты эндолимфонодулярного введения и лимфотропной антибиотикотерапии, дающие сходные, хотя и менее выраженные изменения фармакокинетики, могут считаться разновидностью направленного транспорта антибиотиков [81]. В течение примерно 20 лет были апробированы различные варианты так называемого эндолимфатического введения антибиотиков, удалось представить достаточно аргументированную гипотезу о связи возросшего клинического эффекта с изменениями фармакокинетики лекарственных препаратов, происходящими при таком способе введения. Именно изменения фармакокинетики, сводившиеся к

перераспределению субстанции антибиотика в организме – снижению уровня в системном кровотоке и повышению в очаге воспаления, и можно было назвать реальным вариантом направленного транспорта или направленной доставки лекарственного препарата [82]. Под руководством С.В. Лохвицкого был разработан также метод направленного транспорта антибиотиков малыми объёмами крови, который предусматривал снижение неблагоприятной нагрузки на больного вследствие одномоментного забора небольших объёмов крови и показал целесообразность его применения у пациентов с острыми неспецифическими воспалительными заболеваниями лёгких и плевры и другими гнойными процессами [83]. Сообщается также об успешном применении направленного транспорта антибиотиков с клеточной взвесью из малых объёмов крови при лечении больных диабетической гнойной остеоартропатией. Высокие пролонгированные концентрации антибиотиков в гнойном очаге у больных диабетической остеоартропатией при МОК сказались на результатах лечения больных: очищение раны наблюдалось к 4-5-м суткам, к 6-7-м суткам – уменьшение полостей деструкции и площади раневой поверхности за счёт разрастания грануляционной ткани. При внутривенном введении очищение раны наблюдалось к 7-8-м суткам, грануляции были вялые и при отмене внутривенного введения гентамицина, нередко наблюдалось вторичное нагноение раны. Высокая клиническая эффективность направленного транспорта антибиотиков с клеточной взвесью подтверждается существенным снижением длительности заболевания, снижением количества осложнений, возможностью ограничиться малыми ампутациями и снизить уровень высоких ампутаций [84].

Механизм действия лейкоцитарных носителей связывают со следующим [81, с.14]: после насыщения лекарственными веществами и возврата в кровотоки лейкоциты за счёт хемотаксиса мигрируют непосредственно в очаг воспаления, где путём стимулированного экзоцитоза или после своего разрушения высвобождают пиноцитированный во время инкубации лекарственный препарат. Из-за замедленного выделения препарата из лейкоцитов в сосудистом русле значительно удлиняется, по сравнению с обычным введением, период сохранения в крови эффективных терапевтических концентраций. Проведение направленного транспорта в данном случае обеспечивается получением лейкоцитов при помощи цитафереза.

Таким образом, использование аутолейкоцитов для реализации метода направленного транспорта лекарственных веществ у пациентов с очагами неспецифического воспаления является достаточно перспективным для широкой клинической практики ввиду быстрого достижения клинических результатов, простоты исполнения и невысокой себестоимости проводимых процедур. Однако, ряд вопросов, касающихся механизма действия, оптимизации условий его проведения, перспектив использования метода у пациентов с различной локализацией очагов неспецифического воспаления требует дальнейшего изучения и технологической разработки.

Но сама идея, таким образом, порождает задачу создания комплекса “препарат – носитель”, то есть важно обеспечить значимое связывание

антибиотика клетками. В качестве варианта включения в лейкоциты и другие клетки крови с целью их доставки в очаг воспаления, авторами предложено использование плазмафереза [85, 86]. Доказано, что при цитаферезе, антибиотик поступает в очаг воспаления и концентрируется в нем в большей степени, чем при его введении внутривенно [87]. Инкубация лейкоцитов, получаемых во время плазмафереза, с антибиотиком в результате ведёт к насыщению клеток препаратом и созданию депо антибиотика во внутриклеточной среде. С помощью лейкоцитов происходит перенос антибиотика в очаг воспаления. Период сохранения в крови эффективных терапевтических концентраций значительно удлиняется вследствие замедленного высвобождения препарата из клеток в сосудистом русле, в сравнении с обычным введением [88]. Клиническая результативность направленного транспорта антибиотиков может быть обнаружена на более ранних сроках нормализации состояния больных и снижении числа послеоперационных гнойных осложнений [89-91].

В работе [60, с.12] показано, что применение направленного транспорта антибиотиков в аутологичных лейкоцитах в комплексном лечении больных с острыми воспалительными заболеваниями почек позволяет значительно уменьшить частоту гнойно - септических осложнений, сократить длительность стационарного лечения. Для повышения фиксации антибактериальных препаратов клетками, авторы облучали лейкоцитарную массу гелий - неоновым лазером с длиной волны 633 нм. Имеются данные об успешном использовании лейкоцитов в качестве естественного носителя при проведении направленного транспорта антибиотика цефтазидима при комплексном лечении пациентов с тяжелыми формами пневмонии [92]. Включение указанной методики в комплексную терапию сопровождалось достоверным снижением сроков госпитализации и летальности, а также более редким развитием осложнений пневмонии. Направленный транспорт лекарств аутогенной клеточной массой крови. Наконец, в качестве варианта своего развития технология адресной доставки фармакологических средств рассматривает использование аутогенной клеточной массы крови, получаемой в ходе плазмафереза. Включение различных антибиотиков в аутоклетки крови с целью их дальнейшей доставки в патологический очаг изучено в работе [93]. Авторами выявлена способность таких препаратов, как фторхинолоны, рифампицин, клиндамицин, тетрациклины и хлорамфеникол, концентрироваться внутри клеток. Для улучшения связывания антибиотика с форменными элементами крови и создания устойчивого комплекса «препарат – носитель» было предложено дополнительно инкубировать, полученную в результате отделения плазмы крови лейкоцитарную массу с корректором связывания – АТФ, изменяющим микровязкость мембран клеток и способствующим более выраженному насыщению клеток препаратом. При применении методики реинфузии клеточной массы крови с антибиотиками (цефалоспорины, фторхинолоны) и даларгином при лечении людей, больных панкреонекрозом, отмечено повышение концентрации препаратов в очаге поражения, снижение эндогенной интоксикации, положительные сдвиги клеточного и гуморального иммунитета,

уменьшение побочных воздействий лекарственных средств на организм [94]. Примечательно, что эффективность использования аутоцитозвеси для направленного транспорта лекарств исследователи, как правило, обосновывают преимущественным поглощением препаратов лейкоцитами [95].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что способ доставки лекарственных средств к очагу инфекции для достижения их адекватной концентрации имеет немаловажное значение в успехе лечения тяжелых инфекций.

Например, отмечена клиническая эффективность реинфузии аутогенной клеточной массы крови после её инкубации с антибиотиком (ампициллином) в лечении неосложнённой пневмонии у детей, когда у 68% детей антибиотикотерапия ограничилась однократной реинфузией клеточной массы, в 31,2% случаев реинфузию клеточной массы пришлось повторить через 48 часов. Использование данного способа позволило в более короткие сроки купировать признаки острого воспалительного процесса, снизив при этом дозу антибиотиков в 6-8 раз по сравнению с традиционной схемой [96].

Придерживаясь ведущей роли лейкоцитов в эффективности экстракорпоральной антибиотикотерапии, А.Л. Костюченко рекомендует для получения определённого терапевтического эффекта инкубировать с антибиотиком не менее 3 млрд. клеток взрослого человека. Исходя из клинических данных сеансы трансфузии клеток, экстракорпорально нагруженных бактерицидным антибиотиком, должны повторяться каждые 48 часов [97]. И.А. Карпушина и соавторы [95, с.17] сообщают о применении НТ антибиотиков в комплексном лечении острого панкреатита. Проведение НТ в данном случае обеспечивалось получением аутолейкоцитов при помощи аппаратного цитафереза. Рабочая доза аутолейкоцитов была не менее 10×10^{12} , а кратность применения разовой дозы препарата составила 1 раз в 24-48 часов в зависимости от состояния больного. Повышение фиксации антибактериального препарата клеткой достигалось воздействием на аутовзвесь красным светом гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм (частично за счёт прайминга, частично за счёт фагоцитоза). Вместе с тем неисследованной остаётся роль эритроцитов в механизмах эффективности экстракорпоральной антибиотикотерапии, необходимо дальнейшее исследование фармакокинетики препаратов, вводимых в клеточных носителях.

Предлагают также несколько модифицированный вариант упрощённой методики депонирования антибиотиков в клетках, заключающийся в избирательной седиментации эритроцитов и большей части гранулоцитов в среде биологически инертного коллоида и последующей инкубации лейкоцитов с диуцифоном в растворе Рингера с бикарбонатной буферной системой с добавлением аминокислот и глюкозы [44, с.11]. Авторами получены убедительные результаты применения данной методики в лечении больных сепсисом и тяжёлой гнойной инфекцией. Выявлено уменьшение продукции фактора некроза опухоли мононуклеарными клетками, увеличение содержания CD4 и HLA-DR-положительных клеток, а также лимфоцитов, несущих

рецепторы интерлейкина-2 (ИЛ-2), подавление способности аутологичных нейтрофильных гранулоцитов к адгезии.

А.Л. Костюченко и соавторы [97, с.17] предлагают внутриаартериальное введение аутологичных активированных иммунокомпетентных клеток у больных с инфекционными очагами труднодоступными для хирургической санации. Авторы используют данную методику у больных с гнойными осложнениями после операций на конечностях и у больных с гнойным метроэндометрием после кесарева сечения.

Интересный метод предлагают А.А.Останин и Е.Р.Черных: выделяют мононуклеарные клетки из лейкоцитарной взвеси и культивируют с ронколейкином в течение 24-48 часов с последующей реинфузией активированных клеток пациенту [98].

Таковы результаты основных отечественных исследований.

Принципиально значимые результаты, опубликованные зарубежными исследователями по поводу применения клеточных технологий в системах направленного транспорта мы, используя данные ряда обзорных работ [99-102], сгруппировали в нижеследующую таблицу 1.

Таблица 1 –Типичные варианты клеточных транспортных систем

Тип клеток - носителей	Лекарственная субстанция
1	2
Болезнь Альцгеймера	
Стволовые клетки	ciliary neurotrophic factor (NTFs)
	nerve growth factor (NGF)
	brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
	холин ацетилтрансфераза (ChAT)
Болезнь Паркинсона	
Моноциты, макрофаги	каталаза
	допамин
Стволовые клетки	glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)
	vascular endothelial growth factor (VGEF)
ВИЧ-инфекция	
Моноциты, макрофаги	атазанавир, ритонавир, индинавир
Рак	
Т-лимфоциты	доксорубицин
Стволовые клетки	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)
	интерферон - β
	онколитический онковирус

Продолжение таблицы 1

1	2
Эритроциты	5-фторурацил
	этопозид
	карбоплатин
Лейкоциты	N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA)
	copolymer-gadolinium (Gd) chelates
	интерферон-alpha 2b
Воспаление	
Лейкоциты	бетаметазон
Эритроциты	гликопротеин А
	дексаметазон
Микробные инфекции	
Эритроциты	аминогликозидные антибиотики
	амфотерицин В
Лейкоциты	хлорихин

Относительно новыми направлениями в исследовании проблем лейкоцитарного и эритроцитарного транспорта лекарств можно считать следующие работы:

а) модификация поверхности клеток крови, загруженных лекарствами сурфактантами [103, 104]. Это позволяет менять фармакокинетику, например, избегать преимущественного распределения в селезёнку и печень;

в) использование мембран эритроцитов или лейкоцитов для покрытия наночастиц [105];

с) создание нано-клеточных транспортных систем (лейкоциты, тении эритроцитов, содержащие наночастицы) [106-108].

Таким образом, разработка систем для направленного транспорта лекарственных средств, а именно, антибиотиков, вообще является достаточно актуальной темой. Среди множества опубликованных сообщений выделяются результаты работ, посвящённых клеточным системам доставки антибиотиков ввиду того, что клеточные транспортные системы в настоящее время являются наиболее перспективной стратегией для целенаправленной доставки лекарств в очаги микробного воспаления, т.е., в биофазу действия препарата. Попытки использования клеточных транспортных систем в клинических условиях предпринимались неоднократно в 90-х годах XX века. Однако, ввиду практически полного отсутствия данных относительно фармакокинетики (за исключением предположений о пролонгации эффекта) для антибиотиков, включённых в клеточные транспортные системы, при попытках их использования в клинике дозовые режимы никак не обосновывались, что не позволяло рационально применять данный способ фармакотерапии. До настоящего времени технологии применения транспортных систем для целенаправленной доставки антибиотиков в организме человека на основе аутологичных лейкоцитов или эритроцитов не лицензированы, поскольку не

завершён доклинический этап исследования фармакокинетики. Без описания фармакокинетики и понимания принципов распределения антибиотиков в организме после введения в составе транспортной клеточной системы не представляется возможной трансляция этой технологии в клинику.

Настоящая работа представляет собой попытку оценки параметров фармакокинетики двух клеточных транспортных систем для антибиотиков, что является обязательным этапом всего процесса внедрения новой технологии.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая научная работа основана на материалах экспериментального исследования.

2.1 Материал исследования

В эксперименте использовали 48 половозрелых самцов лабораторных кроликов шиншилла. На момент начала эксперимента средний возраст составил $90 \pm 2,16$ дня. Кролики в среднем весили $2,6 \pm 0,28$ кг и содержались в стандартных условиях типового вивария Карагандинского государственного медицинского университета.

Антибиотик цефтриаксон («Роцефин» Roche, Швейцария)

Реактивы:

АТФ (аденозинтрифосфорная кислота ПРОИЗВОДИТЕЛЬ) 1 мл

Натрия хлорид ч.д.а., (Sigma- Aldrich, США);

Магния сульфат ч.д.а., (Sigma- Aldrich, США);

Калия хлорид ч.д.а., (Sigma- Aldrich, США);

Ацетонитрил HPL Cgrade, $\geq 99.93\%$ (Sigma - Aldrich, США);

Ацетат аммония ч.д.а., (Купавнареактив, Россия)

Сверхчистая вода (тип 1) Millipore (Milli-Q, США)

Стандартный образец цефтриаксона («Роцефин» Roche, Швейцария)

2.2 Создание лейкоцитарной транспортной системы для антибиотика цефтриаксон

«Лейкоцитарная транспортная система» представляет собой вариант методики транспорта антибиотиков с клеточной взвесью, разработанной С.В.Лохвицким и соавторами [79, с.14; 83, с.15; 109]. Ранее было установлено, что при взаимодействии антибиотиков (в том числе и цефалоспоринов) с концентрированной клеточной взвесью основная (70-80%) часть препарата оказывается обратимо связанной с лейкоцитами, остальная часть распределяется между тромбоцитами и эритроцитами [110, 111]. Кроме того, если на эритроцитах и тромбоцитах антибиотик адсорбирован на поверхности клеток и легко диссоциирует из этой связи, то в лейкоцитах он удерживается и на поверхности клеток и во внутриклеточной среде с полностью высвобождается только при разрушении клеток [112, 113]. Эти обстоятельства послужило обоснованием принятия условного названия «лейкоцитарная транспортная системы» для формально транспортной системы, представляющей собой всю массу клеток крови, удерживающих связанный на их поверхности и во внутриклеточной среде лекарственный препарат.

Подготовка препарата, депонированного в лейкоцитах, осуществлялась следующим образом. В шприц объемом 5 мл с 250 ЕД (0,05 мл) гепарина и 0,1 мл полиглюкина (для ускорения осаждения форменных элементов крови) производили забор 2 мл венозной крови кролика. После отстаивания содержимого в штативе в течение 1 часа канюлей кверху плазму удаляли поршнем. В качестве среды для растворения 500 мг цефтриаксона использовали

1 мл стерильного 0,9% раствора NaCl с прибавлением 0,05 мл раствора АТФ. Для улучшения связывания антибиотика с лейкоцитами и создания устойчивого комплекса «препарат – носитель» в полученную цитовзвесь в качестве корректора связывания добавляли 0,05 мл раствора АТФ. Данный препарат изменяет микровязкость мембран клеток и стимулирует выраженное насыщение клеток препаратом. Встряхиванием шприца цитовзвесь смешивали с антибиотиком, после инкубации в термостате при температуре 36-37°C на протяжении получаса, доведя объем крови до 2 мл 0,9% раствором NaCl, проводили его внутривенное введение.

При помощи сотрудников лаборатории экспериментальной фармакологии NLA Назарбаев Университет были сделаны микрофотографии клеточной лейкоцитарной взвеси, полученной нами при инкубации с цефтриаксоном, конъюгированным с флуоресцентным зондом rhodamine 6G-labeled PMPC25-PDPA70 (рисунок 1).

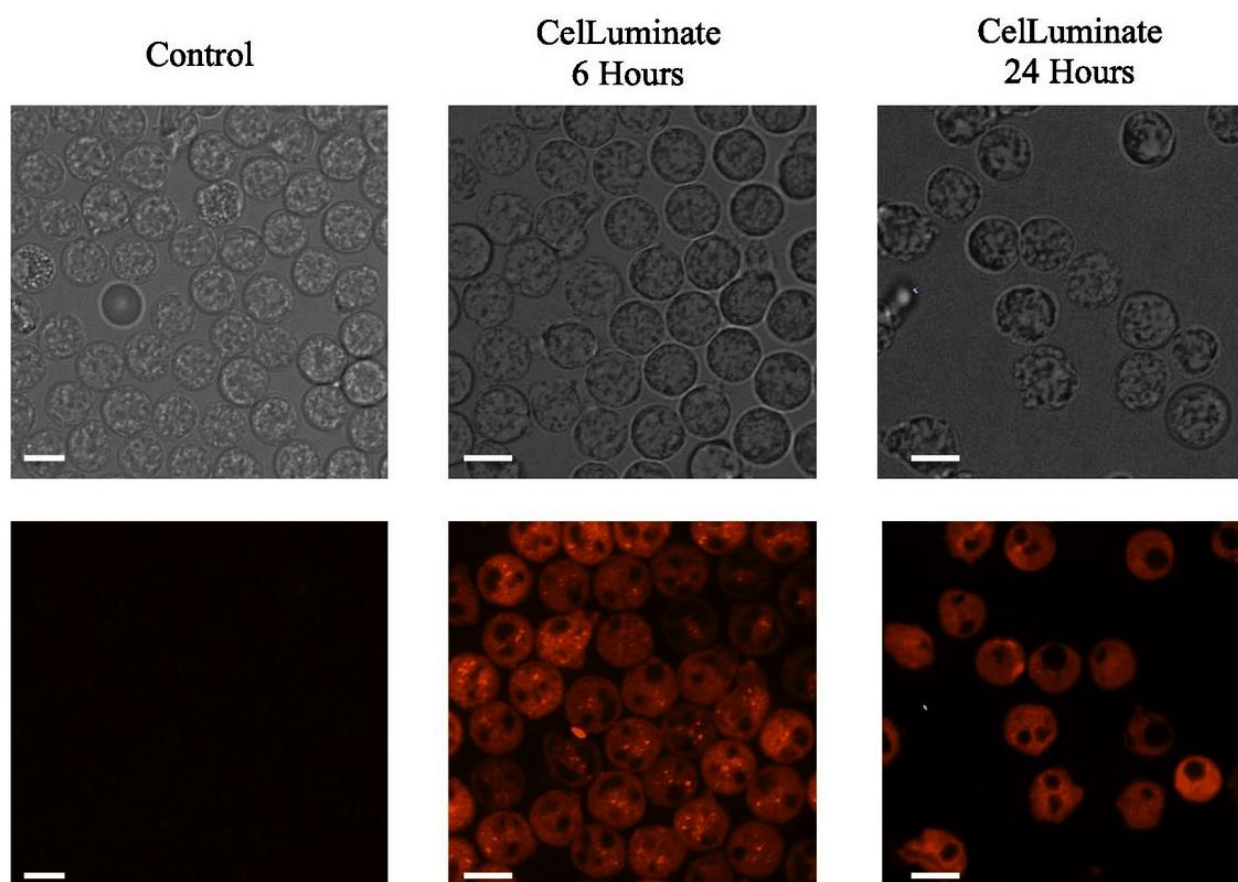


Рисунок 1 - Поглощение лейкоцитарной взвесью меченого цефтриаксона rhodamine 6G-labeled PMPC25-PDPA70. Конфокальная микрофотография при конечной концентрации 1 мг/мл, масштабная линейка, 8 мкм

2.3 Создание эритроцитарной транспортной системы для антибиотика цефтриаксон

«Эритроцитарная транспортная система» представляет собой замкнутые тении эритроцитов, содержащие внутри некоторое количество антибиотика.

Использованная методика является вариантом более ранней методики создания так называемых «фармакоцитов», разработанной Ж.Ш. Жумадиловым, Р.В. Макаренковой и Т.П. Генинг [68, с.13; 72, с.13; 114], а также М.С. Rechsteiner [115] с некоторой модификацией Н. Tajerzadeh, М. Hamidi [116].

С целью подготовки препарата, депонированного в эритроцитах, в вакутейнер объёмом 3 мл с гепарином осуществляли забор 2 мл крови кролика, после 10 мин центрифугирования при скорости 3000 об/мин проводили трехкратное отмывание эритроцитов фосфатным буфером. К 1 мл отмывтых эритроцитов прибавляли 2 мл 0,65% раствора хлорида натрия, осторожно смешивали. После центрифугирования в течение 5 минут при 1000 об/мин проводили удаление супернатанта. К 0,9 мл клеточной взвеси добавляли 500 мг цефтриаксона в разведении с 1 мл 0,9% NaCl. Затем к 1 мл суспензии прибавляли 2 мл 1,1% раствора NaCl, проводили инкубацию при 37°C 30 мин. Препарат в данном виде использовали для внутривенного введения и описания фармакокинетики.

При помощи сотрудников лаборатории экспериментальной фармакологии NLA Назарбаев Университет были сделаны микрофотографии эритроцитарной клеточной взвеси при инкубации с цефтриаксоном (рисунок 2 и 3).

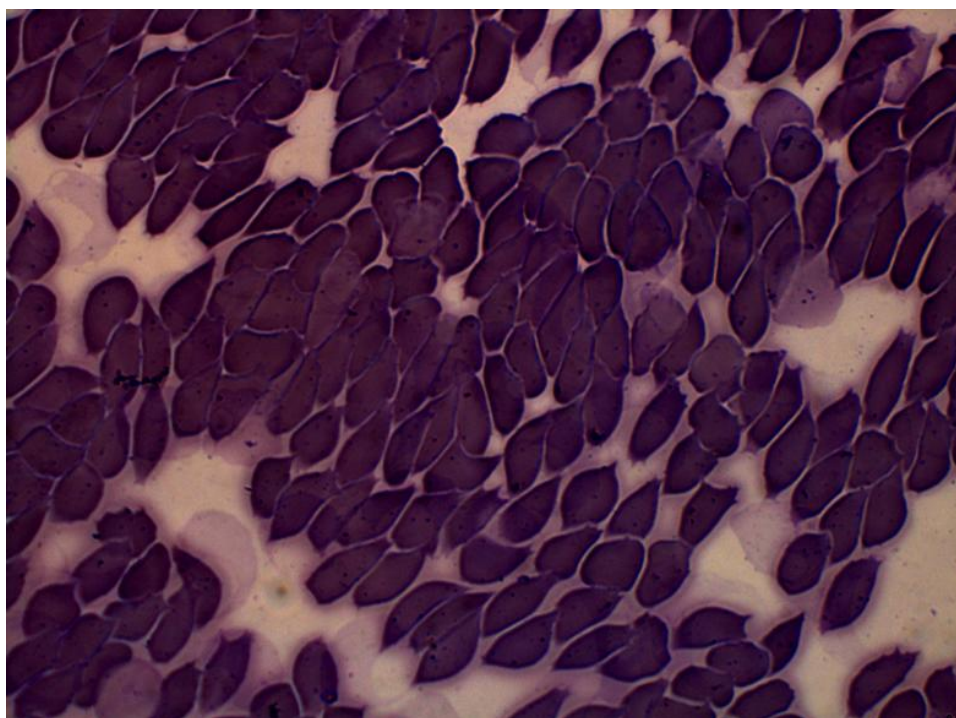


Рисунок 2 – Тени эритроцитов после добавления гипотонического раствора натрия хлорида (0,65%) и перед инкубацией с цефтриаксоном

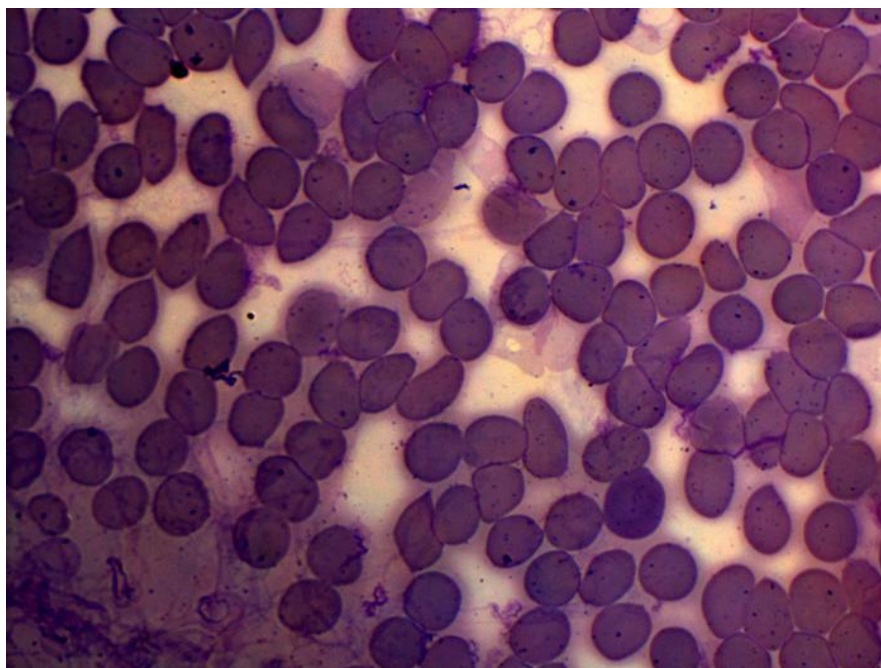


Рисунок 3 - Тени эритроцитов после инкубации с цефтриаксоном и отмывания фосфатным буфером

2.4 Биофармацевтические исследования

Для исследования биофармацевтических параметров связывание/высвобождение тенями эритроцитов и взвесью лейкоцитов крови имитировали реально используемую методику получения эритроцитарной транспортной системы и лейкоцитарной транспортной системы, применяемую в настоящей работе.

Для включения лекарственных препаратов в аутологичные эритроцитарные тени в стерильных условиях у кролика брали рут 5,0 мл крови из подкожной вены на ушной раковине в стерильную пробирку с гепарином (25 ЕД/мл). Пробирку закрывали стерильной пробкой и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли стерильной пипеткой. К осадку эритроцитов приливали 5-ти кратный объем физиологического раствора и центрифугировали в вышеуказанном режиме для отмывания эритроцитов. После повторного отмывания эритроцитов, к осадку добавляли семикратный объем дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Все перемешивали и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 25 мин при 4°C. Супернатант сливали, а к осадку (эритроцитарные тени) приливали инкубационный раствор (6-7 мл дистиллированной воды с цефтриаксоном 1000 мкг) и инкубировали в течение 15-20 мин при 4°C. После чего добавляли 1/9 часть объема 10% хлористого натрия. Взвесь тщательно перемешивали и помещали в термостат на 20-30 мин при 37°C. После этого взвесь разделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 25 мин при 4°C. К осадку добавляли 5 мл дистиллированной воды и подвергали трижды процедуре замораживания/оттаивания для гемолиза эритроцитарных теней. Концентрацию цефтриаксона определяли в супернатанте и в гемолизате.

Для получения депо цефтриаксона в лейкоцитах в шприц объёмом 20 мл с гепарином (25 ЕД/мл) и 1 мл полиглюкина набирали из краевой вены уха кролика 5 мл крови. Взвесь отстаивали непосредственно в шприце, в штативе канюлей кверху в течение 1 ч после чего отстоявшуюся у иглы плазму выдавливали поршнем, и в шприц с клеточной массой набирали цефтриаксон (1000 мкг), растворенный в 1 мл среды 199 с добавлением 0,1 % желатина и 5% сыворотки крови. Взвесь клеток крови с цефтриаксоном инкубировали в термостатируемом встряхивателе при температуре 37°C в течение 30 мин. В процессе инкубации жизнеспособность клеток контролировали по тесту с трипановой синью. Отделение клеток от внеклеточной жидкости проводили фильтрацией через мембранные фильтры Millipore, тип SM (диаметр пор - 5 мкм). Отмытый осадок разрушали повторным замораживанием и оттаиванием в дистиллированной воде. Концентрацию антибиотика определяли в клеточном лизате и фильтрате. Расчёт показателя связывания антибиотика клетками определяли, относя концентрацию препарата в клетках к внеклеточной.

Для определения параметров диссоциации цефтриаксона с эритроцитарными телями (фармакоцитами) и лейкоцитарной массой был использован метод равновесного диализа [117]. Для диализа применялось диализное устройство с использованием полупроницаемой мембраны Servapor® Dialysis Tubing (MWCO 12000-14000; porediameter ca. 25A) (рисунок 4).

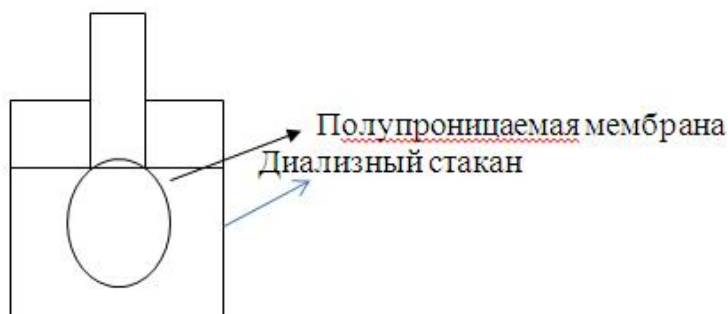


Рисунок 4 - Схема диализного устройства

В диализные мешки вносили эритроцитарные фармакоциты с цефтриаксоном или лейкоцитарную взвесь с цефтриаксоном (расчётная концентрация 10 мг/мл) в объёме 1 мл, в контроле диализные мешки содержали цефтриаксон 10 мг в объёме 1 мл. В диализный стакан вносили изотонический раствор 0,9% натрия хлорида в объёме 15 мл. В контроле и в опыте диализные стаканы оставлялись на 1 ч, 2 ч, 24 ч в термостате при 37°C. Каждый раз меняли изотонический раствор 0,9% натрия хлорида в объёме 15 мл и определяли концентрацию свободного цефтриаксона в диализных стаканах. Расчёт степени высвобождения X (%) проводили по формуле: $X = B/A \times 100\%$, где B – количество цефтриаксона, высвободившегося в диализную среду, г; A – количество цефтриаксона, найденное в контроле. Концентрацию цефтриаксона, высвободившегося в диализную среду определяли через 1 час, 3 часа и 24 часа.

2.5 Исследование фармакокинетики антибиотика цефтриаксон в составе клеточных транспортных систем после однократного внутривенного введения интактным (здоровым) кроликам

Интактных кроликов случайным образом (рандомизация) распределяли на три группы по 6 голов в каждой. В первой группе кроликам внутривенно (в краевую вену уха) вводили 1 мл цефтриаксона в дозе 500 мг, в составе лейкоцитарной транспортной системы (предварительно, по методике описанной в разделе 2.2 готовили препарат с аутоклетками для каждого кролика отдельно); во второй группе кроликов внутривенно вводили 1 мл цефтриаксона в дозе 500 мг, в составе эритроцитарной транспортной системы (предварительно, по методике описанной в разделе 2.2 готовили препарат с теньями аутоэритроцитов для каждого кролика отдельно); в третьей группе кроликам внутривенно вводили 1 мл раствора свободного цефтриаксона в дозе 500 мг, разведённого в 1 мл 0,9% NaCl. В последующем у лабораторных кроликов I, II и III экспериментальных групп проводили забор венозной крови в динамике через 30 мин, 1, 3, 6, 24 часа и определение концентрации антибиотика в плазме крови.

Концентрация антибиотика в сыворотке крови определялась с использованием высокочастотного жидкостного хроматографа (HPLC/MC) Agilent 1260 infinity.

Анализ содержания цефтриаксона в сыворотке крови экспериментальных животных (кроликов) проводился методом высоко эффективной жидкостной хроматографии с УФ детекцией. Был проведён обзор методик количественного определения цефтриаксона [118, 119], по результатам которого сформирована адаптированная к исследованию методика.

Анализ проводился на оборудовании: Хроматографическая система Agilent 1260 Infinity (Насос - G 1311 1260 PumpVL; Автосамплер – G 1329B 1260 ALS; Термостат для колонки G 1316A 1260 TCC; УФ - детектор - G 1314C 1260 VWDVL+) (Agilent Technologies, США). Колонка: ZORBAXE eclipse plus C18 4,6 x 100 мм; 3,5 мкм (Agilent Technologies, США), защитная предколонка: Analytical Guard ColumnXDBC-18 4,6 x 12,5 мм; 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Использовались следующие реактивы:

Ацетонитрил HPL Cgrade, ≥ 99.93% (Sigma- Aldrich, США);

Ацетат аммония ч.д.а., (Купавна реактив, Россия)

Сверхчистая вода (тип 1) Millipore (Milli-Q, США)

Стандартный образец цефтриаксона («Роцефин» Roche, Швейцария)

Пробоподготовка

Депротеинизация: аликвоту образца 200 мкл (плазмы или сыворотки) помещают в пробирку Эпандорф на 1,5 мл и добавляют 600 мкл ацетонитрила, проводят вихревое перемешивание с последующим центрифугированием в течение 7 минут на скорости 14000 оборотов/мин, при температуре 24 °С, затем супернатант извлекают.

Подготовка пробы для анализа: 100 мкл супернатанта переносят в чистую пробирку Эпандорф на 1,5 мл, приливают 100 мкл ацетонитрила и 800 мкл 2

процентного ацетата аммония, проводят вихревое перемешивание. 500 мкл полученного раствора переносят в вials и помещают в автосамплерхроматографической системы.

Проведение анализа

По 20 мкл анализируемой пробы и растворов стандартного образца цефтриаксона попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ - детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях:

- защитная предколонка: Analutical Guard Column XDBC-18, 4,6 x 12,5 мм с размером частиц 5 мкм;
- аналитическая колонка, заполненная сорбентом ZORBAXE clipse plus C18, 4,6 x 100 мм с размером частиц 3,5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил – 2 %-ый раствор ацетата аммония в соотношении 1:9, изократический режим элюирования;
- УФ-детектирование при длине волны 260 нм;
- скорость подвижной фазы 0,250 мл/мин;
- температура колонки + 25°C.

Обработка результатов была выполнена с применением программного обеспечения Agilent Lab Advisor. Количественное содержание цефтриаксона в анализируемых образцах рассчитывают по калибровочному графику. Время анализа 40 минут. Цефтриаксон детектировался на 7, 30 минуте анализа (рисунок 5).

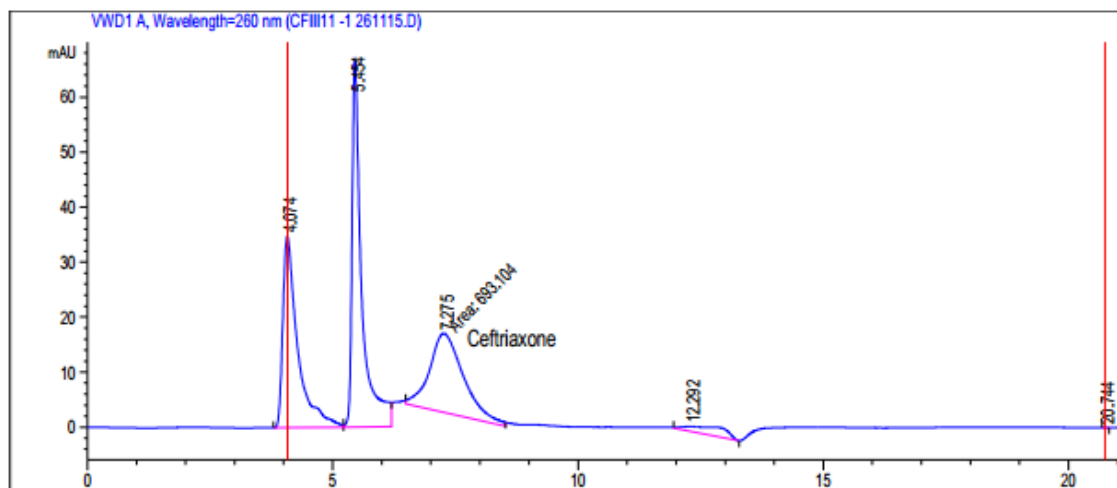


Рисунок 5 - Фрагмент хроматограммы сыворотки крови экспериментального животного через 30 минут после в/в введения Цефтриаксона

2.6 Исследование фармакокинетики антибиотика цефтриаксон в составе клеточных транспортных систем после однократного внутривенного введения кроликам с моделью очаговой гнойной хирургической инфекции

Для исследования были взяты 34 кролика. У каждого кролика делали разрез в области нижней трети левого бедра, затем в клетчатку погружали

марлевый шарик, смоченный в растворе содержащий E.coli + St.aureus (по 1 млрд/мл). На 3-е сутки формировался абсцесс в данной области (рисунок 6 и 7). Абсцесс подтверждается локальным статусом, макропрепаратом и результатами морфологического исследования (рисунки 8).



Рисунок 6 – Формирования абсцесса



Рисунок 7 – Полость абсцесса

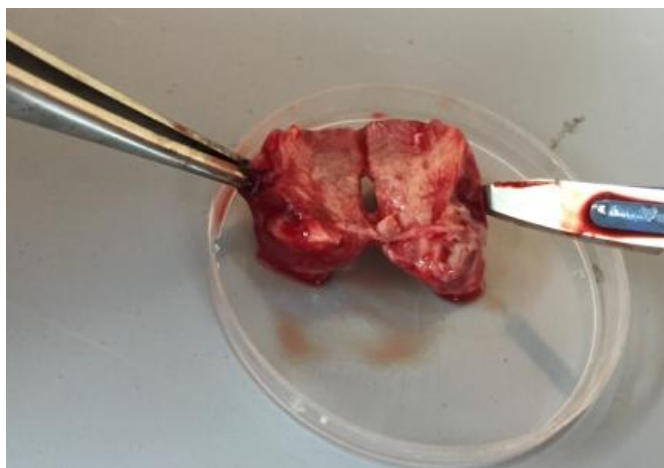
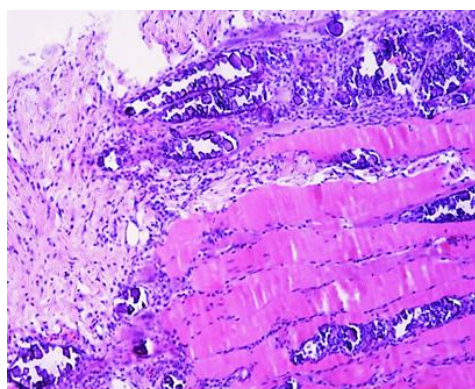
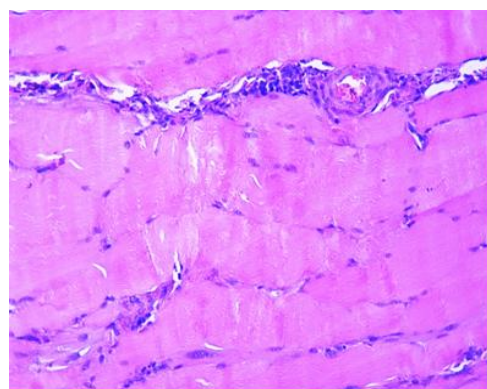


Рисунок 8 – Макропрепарат мышечной ткани

Верифицированная модель осумкованного гнойного абсцесса мягких тканей получена у 30 кроликов. Доказательством наличия модели очаговой гнойной инфекции мягких тканей, кроме макропрепаратов и результатов наружного осмотра кроликов явились микрофотографии образцов тканей из зоны абсцесса, приведённые ниже (рисунок 9).



а)



б)

а – поверхностный гнойно-некротический слой с лейкоцитарной инфильтрацией с формированием абсцессов; б – мышечный слой имеются периваскулярные инфильтраты – васкулиты

Рисунок 9 - Формирование абсцессов в мышечном слое раны.

Окраска: гематоксилином и эозином Ув.: 200

Кроликов случайным образом (рандомизация) распределяли на три группы по 10 голов в каждой. В первой группе кроликам внутривенно вводили 1 мл цефтриаксона в дозе 500 мг, в составе лейкоцитарной транспортной системы (предварительно, по методике, описанной в разделе 2.2, готовили препарат с аутоклетками для каждого кролика отдельно); во второй группе кроликов, внутривенно вводили 1 мл цефтриаксона в дозе 500 мг, в составе эритроцитарной транспортной системы (предварительно, по методике описанной в разделе 2.2 готовили препарат с теньями аутологических эритроцитов

для каждого кролика отдельно); в третьей группе кроликам внутривенно (в краевую вену уха) вводили 1 мл раствора свободного цефтриаксона в дозе 500 мг, разведённого в 1 мл 0,9% NaCl . В последующем у лабораторных кроликов I, II и III экспериментальных групп проводили забор венозной крови в динамике через 30 мин, 1, 3, 6, 24 часа и определение концентрации антибиотика в плазме крови. Также проводилось определение концентрации антибиотика в воспалённом участке мышца (стенка абсцесса) и гное через 24 часа после введения антибиотика (рисунок 10).



Рисунок 10 – Резекция воспалённого участка мышечной ткани

Концентрация антибиотика в сыворотке крови, гное и гомогенате воспалённого участка мышечной ткани определялась с использованием высокочастотного жидкостного хроматографа (HPLC/MC) Agilent 1260 infinity, по методике описанной в разделе 2.5.

2.7 Фармакокинетическое моделирование

При моделировании использовали кинетические уравнения 1-го порядка, линейные. В каждом случае, судя по характеру фармакокинетической кривой, данные по концентрации аппроксимировались в рамках одночастевой без всасывания математической модели, одночастевой со всасыванием модели, двухчастевой со всасыванием модели с использованием фармакокинетической программы Borgia 1.03 и расчётом основных фармакокинетических параметров: периода полураспределения ($t_{1/2\alpha}$, мин), периода полувыведения ($t_{1/2\beta}$, мин), объема распределения в центральной камере (V_1 , мл), стационарного объема распределения (V_{ss} , мл), общего или кинетического объема распределения ($V\beta$, мл), клиренса (Cl , мл/мин), площади под фармакокинетической кривой (AUC), среднего времени пребывания (MRT, мин). Фармакокинетическое моделирование проведено по общепринятым принципам и стандартной методике для направленного транспорта лекарственных средств [120-122].

Основной метод расчета – метод наименьших квадратов и последовательного логарифмирования.

Использовались следующие варианты компартментного моделирования:

1. Однокамерная модель в случае, когда элиминация является кинетическим процессом первого порядка и скорость пропорциональна концентрации в плазме, т.е. лекарство выводится экспоненциально. Математическое уравнение для этого экспоненциального соотношения выглядит так: $C_t = C_0 \cdot e^{-k_{el}t}$, где C_t — концентрация в плазме в данное время (t), C_0 — вычисленная начальная концентрация в плазме при $t = 0$, k_{el} — константа скорости элиминации, e — основание натурального логарифма (рисунок 11).

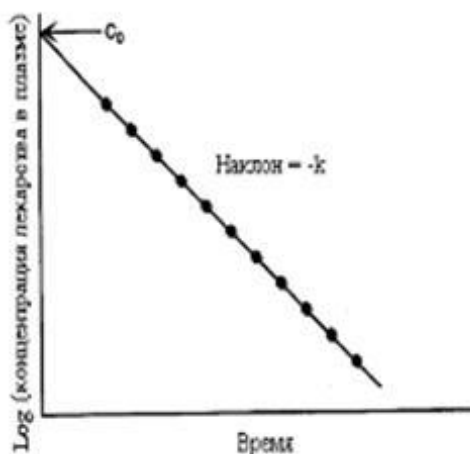
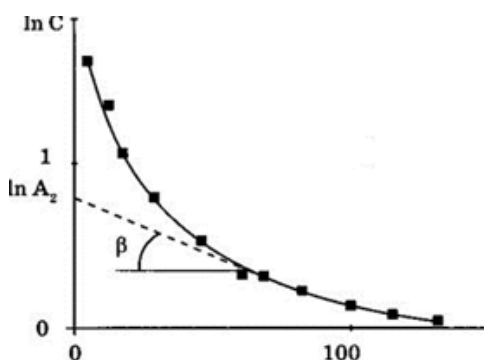


Рисунок 11 - Математическое уравнение для экспоненциального соотношения

2. Кинетика распределения в двухкамерной фармакокинетической системе характеризуется тремя константами скоростей: константой скорости элиминации из центральной камеры (k_e) и константами скоростей распределения (k_{12} и k_{21}). Изменения концентраций в центральной (C_1) и периферической (C_2) камерах модели описываются следующими уравнениями (рисунок 12).



$$C_1^1 = A_1 \cdot e^{-\alpha t} + A_2 \cdot e^{-\beta t}$$

Рисунок 12 - Изменения концентраций в центральной (C_1) и периферической (C_2) камерах модели

2.8 Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проводилась путем сравнения различных способов введения с использованием непараметрического критерия проверки статистических гипотез Н-критерия Краскела - Уоллиса (для $\alpha=0,05$) с последующим post-hoc (апостериорным) множественным сравнением между отдельными группами. Ещё одним методом оценки был ROC - анализ, в котором для сравнения двух путей введения использовался показатель AUC (Area Under Curve).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Результаты биофармацевтического исследования лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных систем для антибиотика цефтриаксон

Степень включения антибиотика цефтриаксон в тени эритроцитов оценивали по убыли концентрации антибиотика из среды инкубации по истечении 30 минут, определяли концентрацию антибиотика в супернатанте и в осадке эритроцитарных контейнеров после их гемолиза, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Концентрация цефтриаксона в тенях эритроцитов и супернатанте (n=6)

Образец	Концентрация в измеряемом образце, мкг/мл	% связывания цефтриаксона тенями эритроцитов
Супернатант	357,0 ±24,0	-
Гемолизат эритроцитов	754,0 ±51,8	67,9%

При внесении в среду инкубации навески в 1000 мкг цефтриаксона, распределение антибиотика между эритроцитами и внеклеточной средой происходило примерно по принципу 1:2. Несколько больше половины внесённого в систему цефтриаксона (67,9%) оказывалось связанным эритроцитарными контейнерами.

Результаты аналогичного эксперимента с лейкоцитарной транспортной системой представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Концентрация цефтриаксона в клеточномлизате и супернатанте (n=6).

Образец	Концентрация в измеряемом образце, мкг/мл	% связывания цефтриаксона- клеточной массой
Супернатант	778,0 ±81,7	-
Клеточная масса лейкоцитов	164,0 ± 56,4	17,4%

Из приведённых данных следует, что после инкубации с клетками во внутриклеточной среде (либо в связи с клетками) оказывается примерно 17,2% внесённого в инкубационную систему антибиотика.

Учитывая невысокие показатели поглощения цефтриаксона клетками крови мы попытались использовать известные корректоры связывания. Далее приведены результаты реализации попытки увеличить клеточное связывание цефтриаксона.

В инкубационную среду вносили ряд субстанций, потенциальных модификаторов процессов связывания лекарственных препаратов плазматическими мембранами клеток [123-125] в таблице 4:

- АТФ 0.5 mM конечная концентрация (за счёт энергии гидролиза АТФ, вероятно стимулируется активный транспорт через мембрану);
- MgSO_4 6 mM конечная концентрация (ионы Mg^{++} , связываясь с клеточными мембранами регулируют их проницаемость и механические свойства);
- KCl 0,25 мг/мл конечная концентрация (ионы K^+ снижают устойчивость мембраны клеток).

Таблица 4 - Влияние корректоров на процесс связывания цефтриаксона (%) транспортными клеточными системами (n=7)

Образец	Контроль	+ АТФ	+ MgSO_4	+ KCl
Тени эритроцитов	69,4%±9,8	60,4 ± 12,6	78,5 ± 9,14	58,6 ± 13,5
Лейкоцитарная масса	15,6±4,1	28,5 ± 2,7*	13,9 ± 4,3	18,3 ± 3,5
Примечание - * - $p < 0,05$				

Как видно, достоверное увеличение показателя связывания цефтриаксона удалось получить только для лейкоцитарной массы в присутствии АТФ.

Для определения параметров диссоциации цефтриаксона с эритроцитарными тенями (фармакоцитами) и лейкоцитарной массой был использован метод равновесного диализа [117, с 25]. Для диализа применялось диализное устройство с использованием полупроницаемой мембраны Servapor® DialysisTubing (MWCO 12000-14000; pore diameter ca. 25Å).

Данные по диссоциации комплексов цефтриаксона с транспортными системами приведены в таблице 5.

Как видно из представленных данных, из фармакоцитов в течение первого часа свободно диффундирует более половины (62,4%) депонированного в них препарата, далее процесс высвобождения замедляется и к концу суток в окружающую среду выходит из фармакоцитов основная масса препарата - 82,9%.

В случае использования лейкоцитарной массы диссоциация цефтриаксона происходит несколько более замедленно, так в течение первого часа высвобождается из клеток около 14%, затем на протяжении трёх часов диффузия идёт на примерно том же уровне и 24 часам из связи с клетками высвобождается более половина препарата (66,7%).

Такие темпы диссоциации комплексов цефтриаксона с эритроцитарными тенями и лейкоцитарными клетками могут предопределять различия в фармакокинетике цефтриаксона в этих транспортных системах. Есть основания предполагать, что цефтриаксон, вводимый с клеточной массой будет более

длительно циркулировать в организме в силу более прочного связывания и депонирования в клетках.

Таблица 5 - Параметры диссоциации цефтриаксона из фагоцитозов и лейкоцитарной массы

Тип контейнера	Исходная концентрация (контроль) мг/мл	Концентрация свободно диффундирующего цефтриаксона					
		1 час		3 часа		24 часа	
		мг/мл	%	мг/мл	%	мг/мл	%
Фагоцитозы	9,35±0,41	5,84±0,25	62,4%	1,98±0,16	56,2%	1,27±0,09	82,9%
Лейкоцитарная масса	9,11±0,27	1,27±0,36	14,0%	1,13±0,08	14,4%	4,47±0,22	66,7%

Таким образом, результаты биофармацевтического исследования лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных систем для антибиотика цефтриаксон позволяют констатировать, что использованный нами антибиотик хорошо депонировался в клетках крови, как в теньях эритроцитов (очевидно внутри замкнутого пространства, образуемого тенью эритроцита), так и в лейкоцитах (как на мембране, так и во внутриклеточной среде). Высвобождение цефтриаксона из депо в клетках крови происходило полно в течение 24 часов. Есть основания считать, что в таком виде, депонированный в клетках антибиотик представляет собой либо эритроцитарную транспортную систему, либо лейкоцитарную транспортную систему.

3.2 Фармакокинетика антибиотика цефтриаксон в составе лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы при однократном внутривенном введении интактным кроликам

На рисунке 13 представлена фармакокинетическая кривая, отражающая изменение уровня концентрации антибиотика цефтриаксон в сыворотке крови интактных кроликов в течение 24 часов после внутривенного однократного введения свободного препарата (раствор антибиотика). В сравнении представлены фармакокинетические кривые, характеризующие изменение концентрации цефтриаксона в сыворотке крови после внутривенного введения в лейкоцитарной транспортной системе и препарата в эритроцитарной транспортной системе.

Логично, что при внутривенном введении свободного цефтриаксона, пиковая концентрация, создаётся видимо сразу после введения, но в условиях нашего эксперимента фиксируется во время первого определения через 30 минут. Дальнейшее снижение уровня концентрации цефтриаксона после введения свободного препарата максимально быстро идёт на протяжении первых 6 часов после введения, затем более медленно до 12 часов, определить значимый уровень концентрации в сыворотке крови через 24 часа после внутривенного введения в условиях нашего эксперимента нам не удалось.

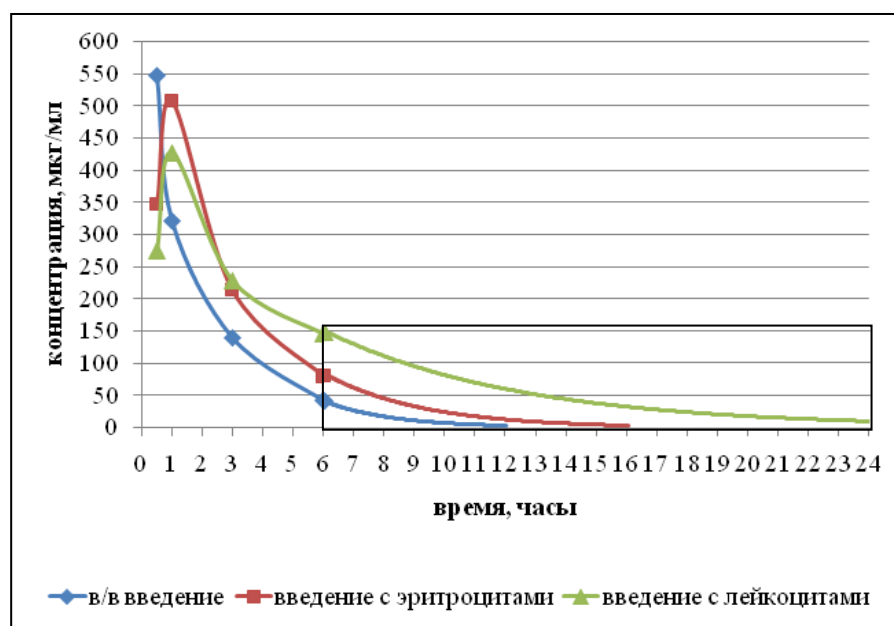


Рисунок 13 - Динамика уровня концентрации цефтриаксона в сыворотке крови (медианы при n=6) при внутривенном введении в исследуемых лекарственных формах

При использовании эритроцитарного транспорта пиковая концентрация создаётся после 60 минут и её значение достоверно ниже, чем после введения свободного препарата. При введении цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы пиковая концентрация в сыворотке крови создаётся ещё позже, и она меньше чем для случая введения свободного препарата и случая введения препарата в эритроцитарной системе. В обоих случаях использования транспортных систем пиковая концентрация цефтриаксона в крови фиксируется только после периода продолжительностью 2-3 часа, когда, очевидно, идёт высвобождение препарата из депо в свободное состояние. На диаграмме хорошо видно, что концентрация препарата снизилась до 0 при внутривенном способе введения в течение 12 ч, при использовании эритроцитарного транспорта – в течение 16 ч, а в группе животных, где применялся лейкоцитарный транспорт, этот процесс продолжался более 24-х часов. При этом обращает на себя внимание, что в первые часы динамика концентрации цефтриаксона была практически одинаковой при всех путях введения, но в дальнейшем появились выраженные различия. Так, спустя 30 мин. после введения статистически значимые различия концентрации отмечались лишь между I (лейкоцитарный транспорт) и III (свободный препарат) группами, спустя 60 мин. – между II (эритроцитарный транспорт) и III группами, а спустя 24 ч – как между I и III группами, так и между I и II группами.

Следует указать, что фармакокинетическая кривая для цефтриаксона в лейкоцитарной транспортной системе и эритроцитарной транспортной системе на стадии элиминации двухфазна, что позволяет в последующем использовать двучастную фармакокинетическую модель для расчёта параметров. При этом

фармакокинетическая кривая присущая цефтриаксону при внутривенном введении свободного препарата линейизуется по всей длине и потому аппроксимирована в пределах одночастевой математической модели.

Результаты фармакокинетического моделирования приведены ниже в таблицах.

В таблице 6 показаны результаты расчёта показателя, характеризующего элиминацию цефтриаксона по времени необходимому для снижения концентрации в сыворотке крови в два раза, $T_{1/2}$ – период полувыведения. Сопоставление периода полувыведения антибиотика при разных формах транспорта выявило, что этот показатель был максимальным в I группе при лейкоцитарном транспорте ($Me=230,1$ мин), а минимальным – в III группе, при введении свободного препарата ($Me=117,8$ мин), тогда как во II группе (эритроцитарная транспортная система), этот показатель занимал промежуточное положение и составил 122,6 мин. Статистическая обработка полученных данных позволила установить, что выявленные различия были статистически достоверными, что наглядно продемонстрировано в таблице 6 и на рисунке 14.

Таблица 6 - Показатели периода полувыведения ($T_{1/2}$, мин) цефтриаксона при внутривенном его введении в исследуемых лекарственных формах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	230,1	188,7	296,2
II	122,6	113,1	153,8
III	117,8	90,46	126,9

Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 18) =11,09; $p=0,004$; p -уровни множественного сравнения: между I и II группой $p=0,033$; между I и III группой $p=0,005$; между II и III группой $p=1,000$

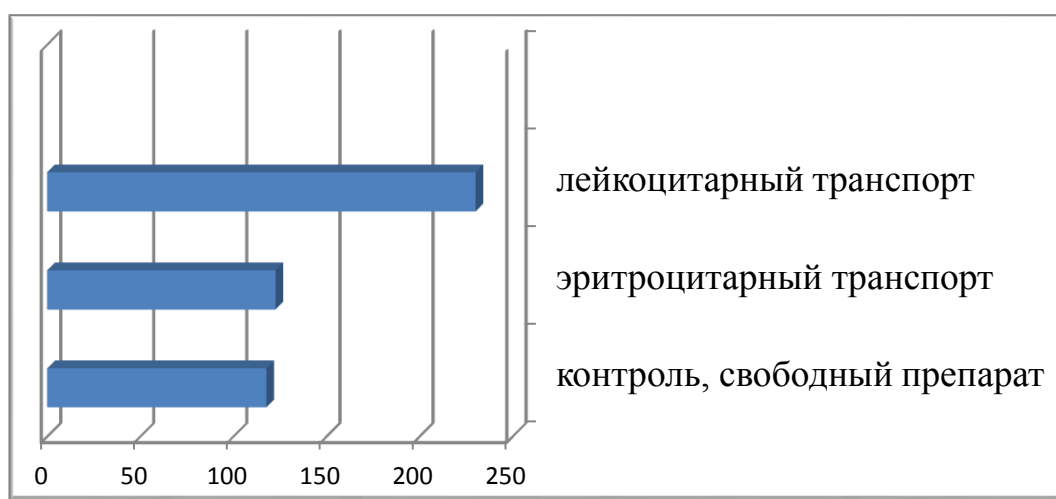


Рисунок 14 - Значения периода полувыведения для цефтриаксона в лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных системах при введении интактным кроликам

Как видно, при введении цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы, период полувыведения существенно удлиняется по сравнению с вариантом стандартного введения свободного препарата, эта же тенденция, но без статистической достоверности, выявлена и для случая введения цефтриаксона в составе эритроцитарных контейнеров.

В следующей таблице 7 приведены числовые характеристики процесса выведения цефтриаксона по параметру константы элиминации. Так, было установлено, что константа элиминации была минимальной в I группе ($Me=0,0030$) и максимальной – во II группе ($Me=0,0064$). При этом статистически достоверные различия зафиксированы между величиной анализируемого показателя в I и II, I и III группах.

Таблица 7 - Численные значения константы элиминации (K_{el}) цефтриаксона при внутривенном введении в исследуемых лекарственных формах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	0,030	0,023	0,037
II	0,044	0,025	0,048
III	0,059	0,055	0,077
Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 18) =10,77; $p=0,005$. p -уровни множественного сравнения: между I и II группой $p=0,067$; между I и III группой $p=0,011$; между II и III группой $p=0,05$			

Из приведённых данных следует, что константа элиминации при введении цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы снижена по сравнению с константой при введении свободного препарата. Для эритроцитарной транспортной системы различия с введением свободного препарата выявить не удалось.

Сравнение кажущегося объёма распределения цефтриаксона в организме кроликов можно провести по данным, представленным в таблице 8. При сопоставлении объёма распределения цефтриаксона в зависимости от формы транспортной системы установлено, что он был наибольшим в I группе ($Me=10,460$ мл), тогда как во II и III группах величины данного показателя были сопоставимы ($Me=7,340$ и $7,650$ мл). Соответственно, статистически достоверные различия выявлены лишь между I и III группами, а также I и II, тогда как различия между II и III группами не достигали статистически значимого уровня.

Можно считать, что выявлен рост кажущегося объёма распределения цефтриаксона при введении препарата в лейкоцитарных контейнерах и тенденция к росту этого показателя при введении цефтриаксона в эритроцитарных контейнерах.

Таблица 8 - Численные значения кажущегося объема распределения (V_{ss} , мл) цефтриаксона при внутривенном введении в исследуемых лекарственных формах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	10,460	9,760	11,510
II	9,650	9,510	10,490
III	7,340	5,580	8,500

Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 18) =10,82; $p=0,005$. p -уровни множественного сравнения: между I и II группой $p=0,09$; между I и III группой $p=0,021$; между II и III группой $p=0,058$

Скорость исчезновения цефтриаксона из организма экспериментальных животных после введения антибиотика в составе сравниваемых транспортных форм сравнивалась по величине тотального клиренса. Минимальный тотальный клиренс был зафиксирован в I группе животных (лейкоцитарная транспортная система) ($Me=8,211$ мл/мин), а максимальный – в III группе (свободный препарат) ($Me=21,30$ мл/мин), во II группе зафиксированы промежуточные значения ($Me=17,26$ мл/мин). Статистически достоверного уровня различия достигали только в I и III и между I и II группами в таблице 9. Эти данные представлены на рисунке 15.

Таблица 9 - Численные значения тотального клиренса (Cl , мл/мин) цефтриаксона при внутривенном введении в исследуемых лекарственных формах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	8,211	6,504	8,669
II	17,26	15,672	21,422
III	21,30	17,882	24,492

Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 18) =10,18; $p=0,006$. p -уровни множественного сравнения: между I и II группой $p=0,013$; между I и III группой $p=0,007$; между II и III группой $p=0,136$

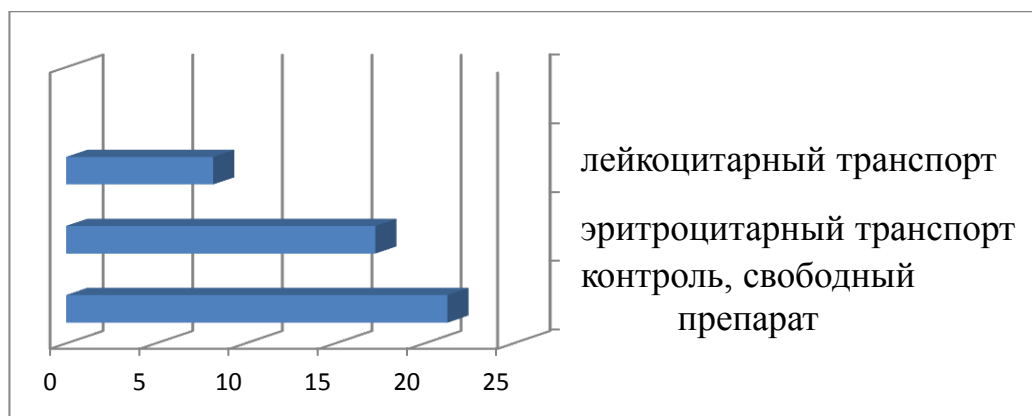


Рисунок 15- Значения клиренса для цефтриаксона в лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных системах при введении интактным кроликам

Интегральная площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» оценивалась по данным таблицы 10. Результаты проведенного ROC-анализа свидетельствуют о том, что наибольшая площадь под кривой была зафиксирована в I группе (Me=16108,3), а наименьшая – в III группе (Me=10464,8). Во II группе значения были промежуточными (Me=12791,8) и достоверно не отличались от показателей в двух других группах.

Таблица 10 - Численные значения интегральной площади под фармакокинетической кривой (AUC, мкг/мл/ч⁻¹) цефтриаксона при внутривенном введении в исследуемых лекарственных формах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	16108,3	14330,3	17259,4
II	12791,8	11934,0	14620,2
III	10464,8	8858,7	10747,8
Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 18) =11,27; p =0,004. p-уровни множественного сравнения: между I и II группой p=0,198; между I и III группой p=0,002; между II и III группой p=0,390			

Рост показателя площади под фармакокинетической кривой цефтриаксона при введении этого антибиотика в лейкоцитарной транспортной системе очевиден по сравнению с вариантом введения свободного препарата.

Более наглядно особенности показателей фармакокинетики цефтриаксона при введении этого антибиотика в клеточных контейнерах можно представить по данным таблицы 11, построенной по результатам post-hoc анализа.

Таблица 11 - Множественное post-hoc (апостериорное) сравнение фармакокинетических параметров цефтриаксона в зависимости от формы внутривенного введения у интактных кроликов

Фармакокинетические параметры цефтриаксона	1-2	1-3	2-3
Half-elimination period, min (T _{1/2})	0,041170	0,005133*	0,033116*
Elimination constant (K _{el})	1,000000	0,010501*	0,017459*
Distribution volume, ml (V)	1,000000	0,020572*	0,008817*
Clirens, ml/min (Cl)	0,136264	0,007382*	0,912693
Area under curve (AUC)	0,390027	0,002402*	0,197962
Примечание - * - p – уровни, указывающие на статистически значимые различия; 1 - свободный препарат, 2 - депонированный в эритроцитах, 3 - депонированный в лейкоцитах			

Как видно, статистически достоверные сдвиги фармакокинетики зафиксированы в условиях нашего эксперимента в отношении обоих вариантов клеточных транспортных систем.

При введении цефтриаксона в составе эритроцитарных теней (эритроцитарная транспортная система) выявлено повышение показателя

периода полувыведения на фоне снижения константы элиминации, а также рост кажущегося объёма распределения. При использовании лейкоцитарной транспортной системы для внутривенного введения антибиотика цефтриаксона intactным кроликам фармакокинетика меняется в более значительной степени: увеличивается период полувыведения, что очевидно связано с уменьшением константы элиминации и тотального клиренса. Как следствие этих изменений, при данном способе введения увеличивается интегральная площадь под кривой «концентрация – время». Для эритроцитарной и лейкоцитарной транспортной системы цефтриаксона в условиях настоящего эксперимента, при внутривенном введении intactным кроликам, общим является удлинение периода полувыведения, снижение константы элиминации и увеличение объёма распределения.

В небольшом фрагменте работы, проведённом совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии NLA Назарбаев Университета (А.Гуляев, Ш. Сергазы) были получены на аппарате IVIS Spectrum In Vivo Imaging System иллюстрации распределения зонда Alexa Fluor 680 (рисунок 16), включённого в состав лейкоцитарной транспортной системы. Эксперимент проведён на 2 мышах самцах линии balb/c с массой тела около 20 г.

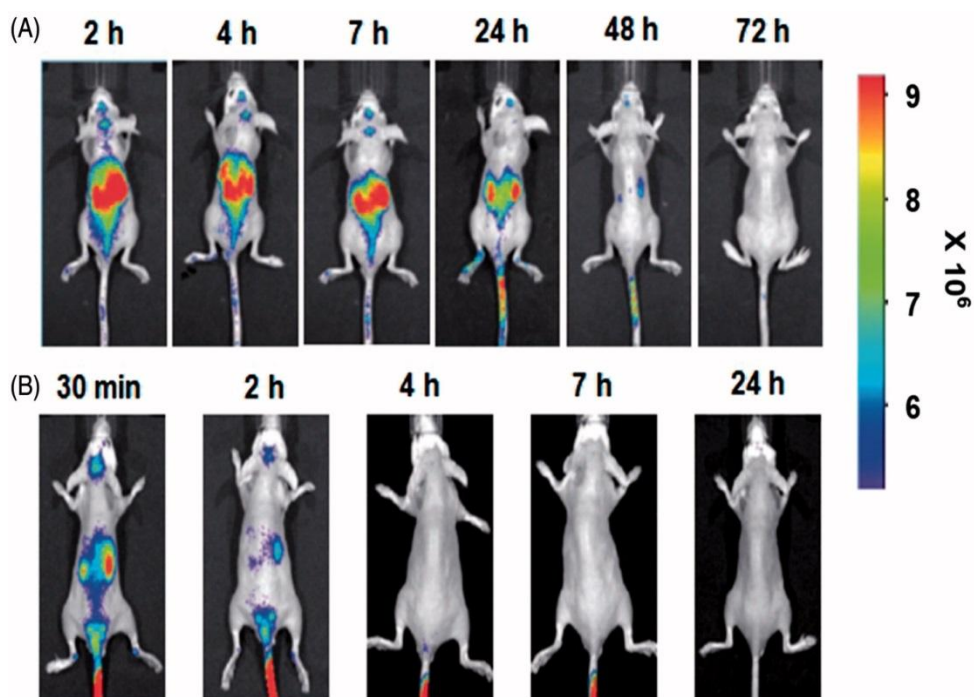


Рисунок 16 - Распределение Alexa Fluor 680 в организме мышей после внутривенного введения препарата в составе лейкоцитарной транспортной системы (A) и свободного препарата (B)

Alexa Fluor 680 растворяли в 0,5 мл стерильного буферного раствора, содержащем 122 мм NaCl, 25 мм NaHCO₃, 10 мм глюкозы, 3 мм KCl, 0.4 мм K₂HPO₄, и 10 мм HEPES, после инкубации клетки промывали два раза ледяным PBS.

Чтобы уменьшить тушение флуоресценции меха мыши линии balb/c были выбриты и держались на жидкой диете в течение 48 часов до эксперимента. Alexa Fluor 680 депонированный в лейкоцитарную систему (предварительно из бедренной вены получали 1 мл крови и далее поступали в соответствии с вышеописанной методикой приготовления лейкоцитарной системы) вводили в хвостовую вену в объёме 0,1 мл. Контрольной группе вводили только свободный препарат (без клеточных носителей). Для оценки уровня фоновой флуоресценции все животные были изображены перед инъекциями в системе IVIS 200.

Как следует из представленного рисунка 16, флюорохром, заключённый в лейкоцитарную транспортную систему фиксируется на протяжении 48 часов, располагаясь преимущественно в области печени и селезёнке, а после 24 часов – в почках, в первые 24 часа видно также распределение в ткань лёгкого и головного мозга. При введении свободного препарата Alexa Fluor 680 фиксируется в сосудах в пределах 7 часов, максимально накапливаясь в селезёнке, меньше печени и лёгких, установлен также переход в головной мозг.

Очевиден факт пролонгации пребывания субстанции, связанной с лейкоцитарной транспортной системой, в организме, а также факт преимущественного распределения депонированной субстанции в тканях ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) или тканях системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

3.3 Фармакокинетика антибиотика цефтриаксон в составе лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы при однократном внутривенном введении кроликам с моделью очаговой гнойной хирургической инфекции

В данном разделе работы описываются результаты исследования фармакокинетики цефтриаксона, введённого внутривенно в лейкоцитарных или эритроцитарных контейнерах кроликам, у которых имелся абсцесс мягких тканей, как модель хирургической очаговой инфекции.

Фармакокинетическая кривая «уровень концентрации – время» представлена на рисунке 17.

При сравнительном анализе динамики концентрации антибиотика в плазме крови в зависимости от лекарственной формы было установлено, что максимально быстрое падение концентрации отмечалось в группе, где животным вводили внутривенно свободный антибиотик, а наиболее медленное – в группе, где вводился антибиотик в составе лейкоцитарной транспортной системы (рисунок 17).

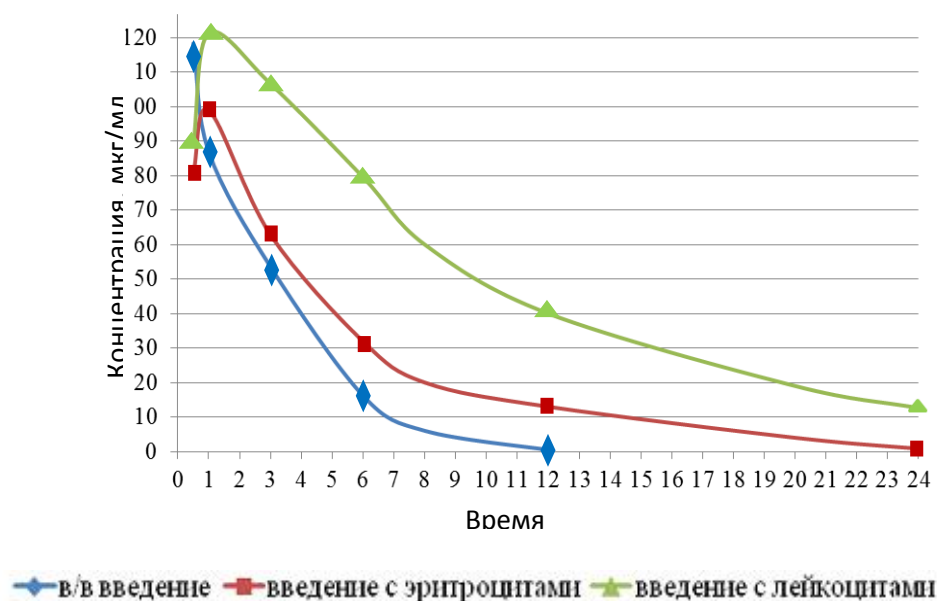


Рисунок 17 – Уровень концентрации цефтриаксона (медианные значения при n=6) в сыворотке крови кроликов с абсцессом мягких тканей при внутривенном введении в разных лекарственных формах

На рисунке видно, что при внутривенно введении свободного цефтриаксона фармакокинетическая кривая почти линейна и отражает процесс элиминации препарата на протяжении 12 часов. При первом взятии пробы крови, через 30 минут после введения максимальный уровень концентрации цефтриаксона в плазме крови был зафиксирован именно для варианта внутривенного введения свободного препарата. Через 24 часа после введения зафиксировать уровень концентрации цефтриаксона в сыворотке крови в условиях нашего эксперимента не удалось.

Динамика изменений уровня концентрации цефтриаксона в сыворотке крови после введения препарата в клеточных транспортных системах в целом схожа: в течение первых 2 часов идёт высвобождение препарата из контейнеров и рост его концентрации в крови, а далее видна элиминация препарат в виде двухфазно снижающейся фармакокинетической кривой.

При схожем типе фармакокинетической кривой на рисунке выявляется значительная разница в уровне концентрации цефтриаксона, введённого в составе лейкоцитарных контейнерах по сравнению с цефтриаксоном, введённом в эритроцитарных носителях: начиная с третьего часа лейкоцитарная транспортная система создаёт в крови уровень концентрации превышающий таковой при введении эритроцитарной системы. Во всех контрольных временных точках, кроме первой, уровень концентрации антибиотика в плазме, при его депонировании в лейкоцитах, был статистически значимо выше, чем уровень концентрации антибиотика, депонированного в эритроцитах и уровень концентрации антибиотика при внутривенном введение свободного препарата. Через 24 часа после введения в группе животных с лейкоцитарным транспортом антибиотика, его концентрация в плазме крове составляла более 10 мкг/мл, к этому времени в группе животных с

эритроцитарный транспорт концентрации приблизилась к нулю. Из рисунка, при внутривенном способе введения в свободном виде снизилась намного раньше в течение 12 часов после введения.

Поскольку в данном фрагменте работы моделировалась у кроликов очаговая гнойная хирургическая инфекция, то уровень концентрации внутривенно введённого антибиотика определялся однократно, через 24 часа после введения, в очаге воспаления – гнойном содержимом абсцесса и мышечной ткани, непосредственно входящей в зону абсцесса. Данные представлены на рисунке 18.

Как видно, определение концентрации антибиотика в мышечной ткани из зоны абсцесса через 24 часа после введения, установили существенно разный уровень концентрации во всех трех экспериментальных группах. Самая высокая концентрация наблюдалась в случае лейкоцитарного транспорта антибиотика (Медиана = 15,49 мкг/мл), несколько меньшая концентрация создавалась в мышцах после введения эритроцитарной транспортной системы (Медиана = 8,916 мкг/мл; $p=0,031$) и минимальная концентрация была при внутривенном введении свободного препарата (Медиана = 3,830 мкг/мл; $p=0,000$).

Аналогичная ситуация наблюдалась и с концентрациями цефтриаксона в гнойном отделяемом из абсцесса через 24 часа после его внутривенного введения в разных лекарственных формах. При лейкоцитарном транспорте наблюдалась самая высокая концентрация антибиотика (Медиана = 9,795 мкг/мл) и она статистически значимо отличалась от таковой в очаге инфекции при эритроцитарном транспорте (Медиана = 4,880 мкг/мл; $p=0,016$) и при внутривенном введении свободного препарата (Медиана = 5,159 мкг/мл; $p=0,000$).

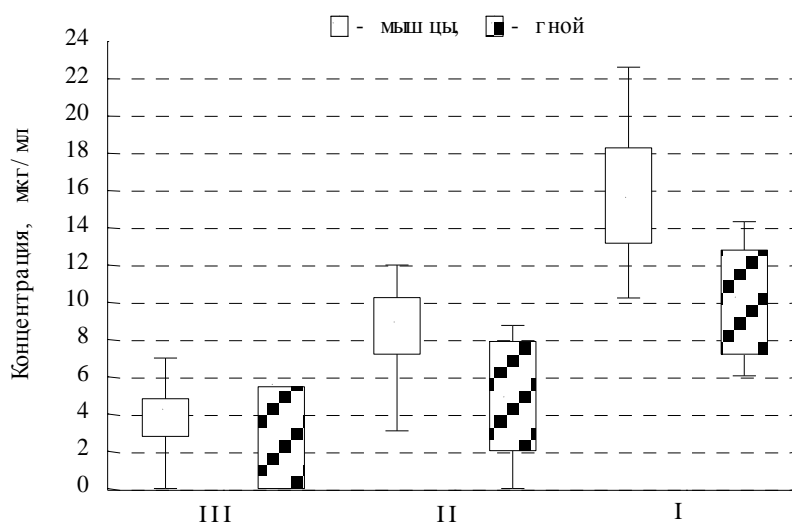


Рисунок 18 – Концентрация цефтриаксона (медианы; квартили; минимальное и максимальное значение) в мышцах и гное через 24 часа после внутривенного введения в разных лекарственных формах

Значения параметра F (биодоступность или переход лекарственного препарата из центральной камеры (в данном случае, - кровь) в периферическую (в данном случае, - очаг гнойного воспаления) показаны на рисунке 19.

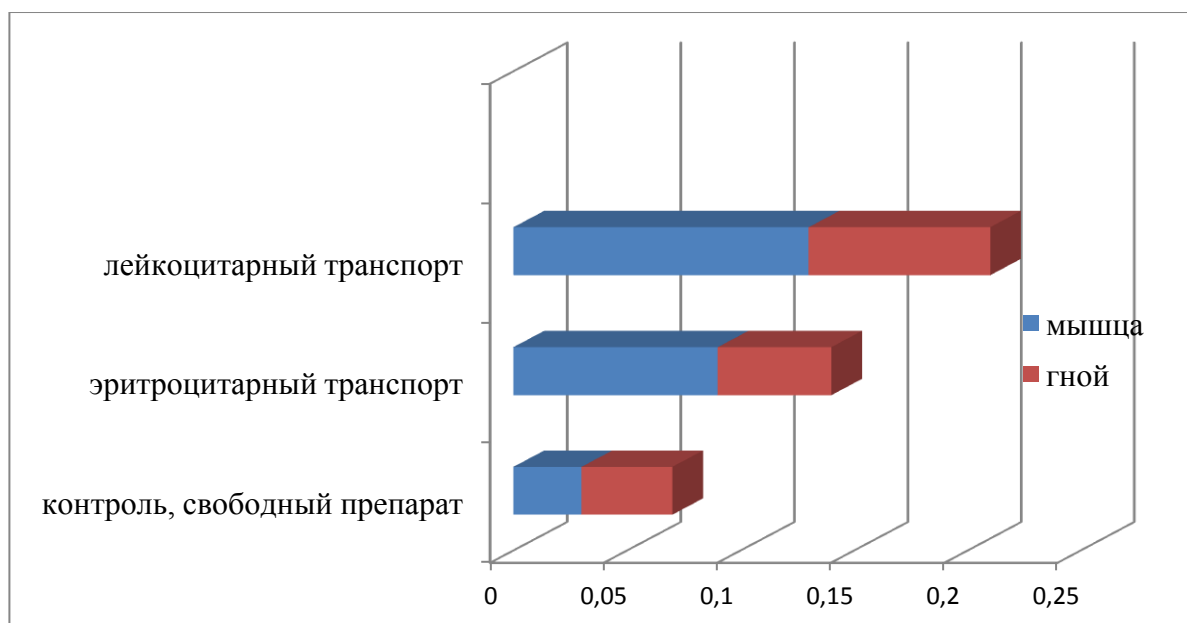


Рисунок 19 – Интенсивность перехода цефтриаксона из крови в очаг гнойного воспаления при введении антибиотика в составе клеточных транспортных систем

Установлено, что при введении цефтриаксона в составе эритроцитарной транспортной системы переход препарата из крови в гной, судя по параметру F (переход из центральной камеры в периферическую) увеличивается с 0,04 до 0,05, а в воспалённые мышцы с 0,03 до 0,09.

При введении цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы переход из крови в очаг воспаления возрастает ещё в большей степени: в гной – в 2 раза, с 0,04 до 0,08 в воспалённые мышцы - в 4 раза, с 0,03 до 0,13.

Численные данные по уровню концентрации цефтриаксона после внутривенного введения свободного препарата аппроксимировались в рамках одночастевой модели без всасывания, а после внутривенного введения в клеточных системах – в рамках двучастевых моделей.

В таблице 12 приведена характеристика величины периода полураспределения. Сопоставление фармакокинетики цефтриаксона при его внутривенном введении в разных лекарственных формах показало, что быстрее всего антибиотик распределялся по тканям организма при внутривенном введении свободного препарата и медленнее всего при введении в форме депонирования в лейкоцитах. На это указывал период полураспределения, который был минимальным в III группе (Медиана = 29,22 мин), максимальным в I группе (Медиана = 167,4 мин), тогда как во II группе этот показатель занимал промежуточное положение (Медиана = 59,23 мин). Статистический

анализ полученных данных позволил установить, что выявленные различия были статистически значимыми.

Таблица 12 - Результаты статистического анализа значений периода полураспределения ($t_{1/2\alpha}$, мин) цефтриаксона в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	р-уровень
I	167,4	46,37	265,6	8,101	0,017
II	59,23	40,24	109,8		
III	29,22	5,919	80,13		
Примечание - р-уровни множественного сравнения: между I и II группой р=0,402; между I и III группой р=0,013; между II и III группой р=0,535					

В таблице 13 показаны значения периода полувыведения цефтриаксона. Как следует из этих данных, антибиотик, депонированный в лейкоцитах, медленнее элиминировался из организма экспериментальных животных, особенно по сравнению с внутривенно введенным свободным антибиотиком. Так время снижения концентрации цефтриаксона в плазме на 50% от введенного количества препарата было наибольшим в I группе (Медиана = 463,8 мин) и статистически значимо отличалось от такового в III группе (Медиана = 155,2 мин). Данный показатель у животных II группы (Медиана = 245,1 мин) опять занимал промежуточное положение и статистически значимо не отличался от значений в других экспериментальных группах (рисунок 20).

Таблица 13 - Результаты статистического анализа значений периода полувыведения ($t_{1/2\beta}$, мин) в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	р-уровень
I	463,8	340,5	698,6	9,012	0,011
II	245,1	227,0	368,6		
III	155,2	137,7	369,0		
Примечание - р-уровни множественного сравнения: между I и II группой р=0,099; между I и III группой р=0,011; между II и III группой р=1,000					

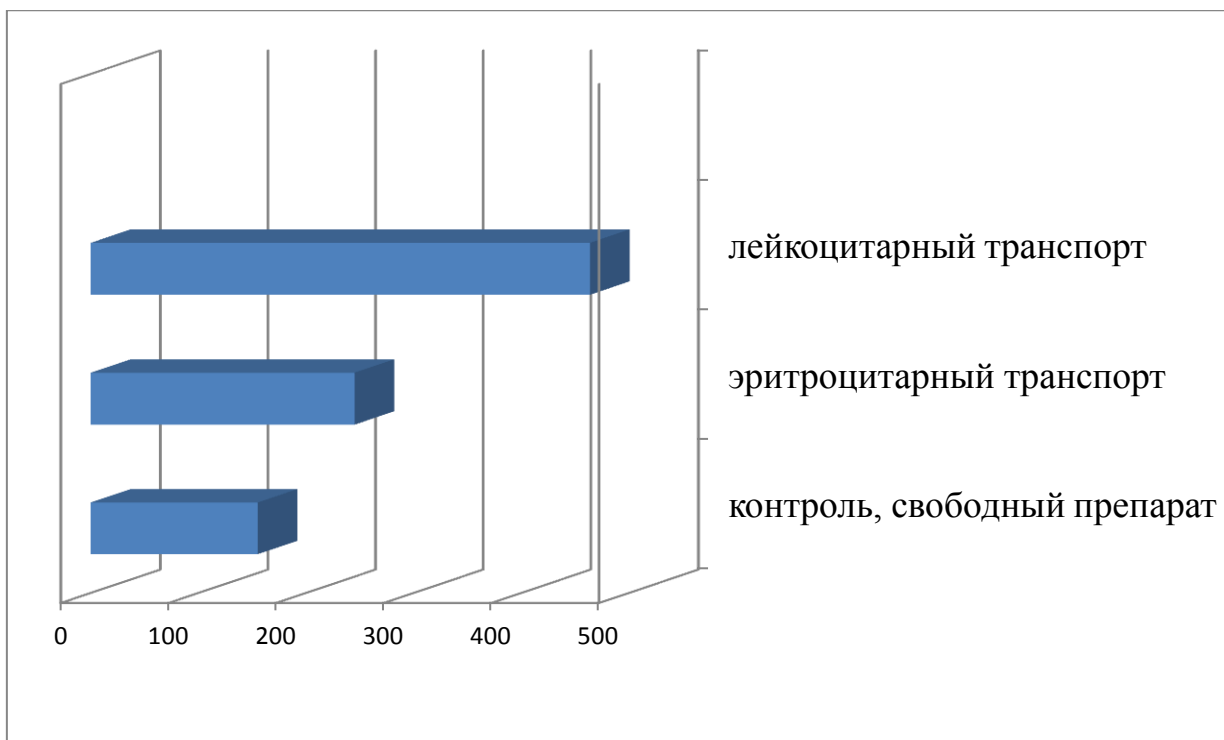


Рисунок 20 - Значения периода полувыведения для цефтриаксона в лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных системах при введении кроликам с моделью очаговой инфекции

Во всех трёх экспериментальных группах период полураспределения цефтриаксона был меньше его периода полуэлиминации - это свидетельствовало о том, что вне зависимости от вида лекарственной формы его введения, антибиотик распределялся из центральной камеры (кровь и хорошо перфузируемые органы) в периферическую (кожа, жировая, мышечная ткани) быстрее, чем элиминировался.

Сразу после внутривенного введения, в нулевой момент времени, общий объем распределения исследуемого препарата определялся объемом его распределения в центральной камере (фармакокинетический показатель V_1). По мере распределения препарата в периферической камере общий объем распределения возрастал, достигая величин стационарного объема распределения (V_{ss}) и кинетического объема распределения (V_β). Сравнительный анализ данных фармакокинетических показателей в исследуемых экспериментальных группах не выявил статистически значимых различий между ними в таблице 14.

Таблица 14 - Результаты статистического анализа значений объёма распределения (V, мл) цефтриаксона в исследуемых группах

Параметр	Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	p-уровень
V _{ss}	I	3,91	2,91	8,44	4,699	0,095
	II	5,29	2,63	8,56		
	III	4,13	3,56	5,80		

В следующей таблице 15 приведены численные значения константы элиминации цефтриаксона при внутривенном введении в исследуемых транспортных формах кроликам с моделью очаговой гнойной хирургической инфекции.

Таблица 15 - Результаты статистического анализа значений константы элиминации (K_{el}) цефтриаксона в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
I	0,020	0,016	0,024
II	0,040	0,030	0,050
III	0,045	0,040	0,060

Примечание - Н-критерий Краскела-Уоллиса Н (2, N= 30) =12,59; p =0,0018. p-уровни множественного сравнения: между I и II группой p=0,018971; между I и III группой p=0,002630; между II и III группой p=1,000000

Следует из приведённых данных, что константа элиминации минимальна для варианта введения антибиотика в лейкоцитарной транспортной системе, для эритроцитарной транспортной системы этот показатель по сравнению с введением свободного препарата практически не меняется.

По результатам сравнительного анализа значений клиренса цефтриаксона в таблице 16 выявлено, что скорость выведения антибиотика из организма животных во II (Медиана = 15,26 мл/мин) и III (Медиана = 19,32мл/мин) группах была статистически значимо выше, чем в I группе, где процесс освобождение организма от антибиотика происходил медленнее всего.

Таблица 16 - Результаты статистического анализа значений клиренса (Cl, мл/мин) в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	p-уровень
I	6,211	4,493	6,558	20,05	0,000
II	15,26	13,56	19,31		
III	19,32	16,77	23,38		
Примечание - p-уровни множественного сравнения: между I и II группой p=0,003; между I и III группой p=0,000; между II и III группой p=0,893					

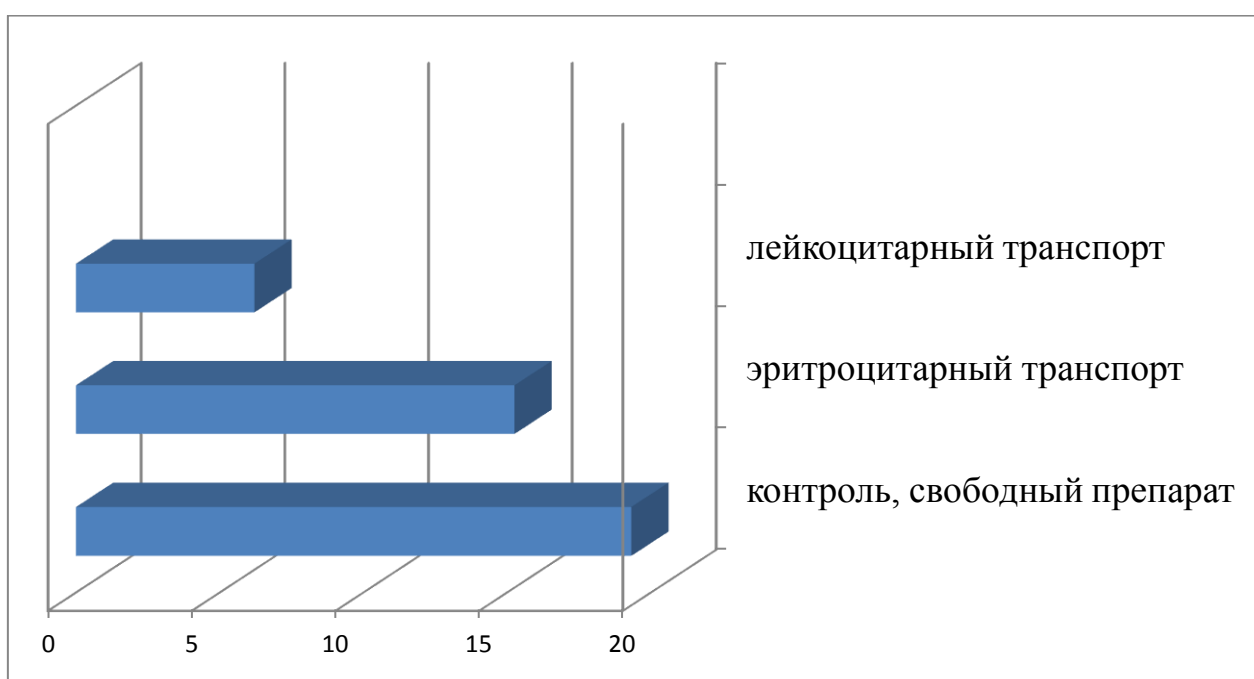


Рисунок 21 - Значения клиренса для цефтриаксона в лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных системах при введении кроликам с моделью очаговой инфекции

Интегральный параметр, характеризующий степень биологической доступности препарата - это площадь под фармакокинетической кривой, значения которой представлены в таблице 17. В I группе данный фармакокинетический показатель был по медиане в 2,5 раза выше по сравнению с его значениями во II группе и в 3 раза выше, по сравнению с III группой. Выявленные различия были статистически значимыми (рисунок 22).

Таблица 17 - Результаты статистического анализа значений площади под фармакокинетической кривой (AUC) в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	p-уровень
I	50508,5	56237,1	61277,2	20,05	0,000
II	22776,9	15893,9	26883,4		
III	15886,6	11384,7	19820,9		
Примечание - р-уровни множественного сравнения: между I и II группой р=0,003; между I и III группой р=0,000; между II и III группой р=0,893					

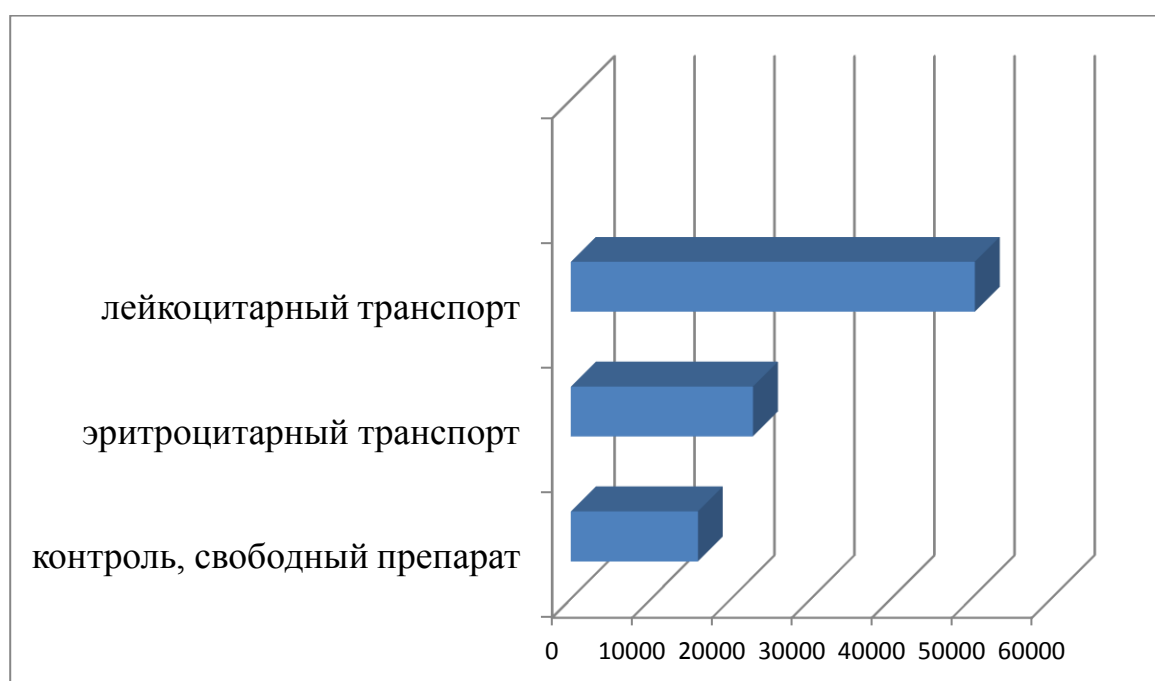


Рисунок 22 – Площадь под фармакокинетической кривой для цефтриаксона в лейкоцитарной и эритроцитарной транспортных системах при введении кроликам с моделью очаговой инфекции

И наконец, общее среднее время сохранения стационарной концентрации цефтриаксона в организме у экспериментальных животных I группы по медиане приблизительно в 3 раза превышало и статистически значимо отличалось от времени пребывания данного антибиотика в организме животных II и III групп в таблице 18.

Результаты интегрального post-hoc анализа представлены в таблице 19.

Таблица 18 - Результаты статистического анализа значений среднего времени пребывания (MRT, мин.) в исследуемых группах

Группа	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Н-критерий Краскела-Уоллиса (2, N= 30)	р-уровень
I	531,5	408,8	844,3	13,66	0, 001
II	191,2	131,3	247,4		
III	197,1	168,6	301,4		
Примечание - р-уровни множественного сравнения: между I и II группой р=0,004; между I и III группой р=0,004; между II и III группой р=1,000					

Таблица 19 - Множественное post-hoc (апостериорное) сравнение фармакокинетических параметров цефтриаксона в зависимости от формы внутривенного введения у кроликов с моделью очаговой инфекции

Фармакокинетические параметры цефтриаксона	1-2	1-3	2-3
Half-distribution period, min ($T_{1/2\alpha}$)	1,000000	0,004824*	0,007247*
Half-elimination period, min ($T_{1/2\beta}$)	1,000000	0,002146*	0,014111*
Elimination constant (K_{el})	0,046480	0,032137*	0,034629*
Distribution volume, ml(V)	1,000000	1,000000	1,000000
Clrens, ml/min (Cl)	0,136264	0,004169*	0,093681
Area under curve (AUC)	0,030027	0,003713*	0,071074
Примечание - р – уровни, указывающие на статистически значимые различия; 1 - свободный препарат, 2 - депонированный в эритроцитах, 3 - депонированный в лейкоцитах			

Как видно из полученных результатов, при внутривенном введении цефтриаксона в лейкоцитарной, равно, как и эритроцитарной транспортной системе достоверно увеличивается период полураспределения, период полувыведения при снижении константы элиминации. Для лейкоцитарной транспортной системы дополнительно выявлено, что достоверно снижается тотальный клиренс и растёт значение площади под фармакокинетической кривой.

3.4 Сравнение показателей фармакокинетики цефтриаксона у интактных кроликов и кроликов с моделью очаговой хирургической инфекции

Вероятность изменения типичной фармакокинетики цефтриаксона, описанной на интактных животных, при моделировании гнойного очага в виде абсцесса мягких тканей оценивалась в данном фрагменте работы.

В таблице 20 приведены параметры фармакокинетики исследуемого антибиотика цефтриаксона при внутривенном введении кроликам с моделью

очаговой хирургической инфекции в виде абсцесса мягких тканей в сравнении с параметрами фармакокинетики цефтриаксона при внутривенном введении intactным кроликам.

Таблица 20 - Сопоставление фармакокинетических показателей цефтриаксона в свободном состоянии, присущих intactным животным и животным с моделью абсцесса

Показатель	Intactные животные			Животные с моделированным абсцессом			U-критерий Манна-Уитни; p-уровень
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	
$T_{1/2\beta}$	117,82	90,46	126,90	155,17	137,72	369,01	U=4; p=0,005
K_{el}	0,059	0,055	0,077	0,050	0,050	0,060	U=22; p=0,386
V	7,34	5,58	8,50	4,13	3,56	5,80	U=12; p=0,061
Cl	21,30	17,882	24,492	19,32	16,77	23,38	U=9; p=0,080
AUC	10464,8	8858,7	10747,8	15886,6	11384,7	19820,9	U=3; p=0,005

Как следует из представленных данных, в условиях нашего эксперимента нам удалось зафиксировать следующие изменения фармакокинетических параметров антибиотика при распределении его в организме кролика с очагом гнойной инфекции: удлинение периода полувыведения и увеличение площади под фармакокинетической кривой на фоне статистически не подтверждённой тенденции к снижению клиренса и объёма распределения.

В следующей таблице 21 приведены параметры фармакокинетики цефтриаксона при внутривенном введении этого антибиотика в составе лейкоцитарной транспортной системы intactным кроликам и кроликам с моделью абсцесса мягких тканей.

Как следует из ниже представленных данных, наличие очага гнойной инфекции в виде абсцесса мягких тканей приводит к некоторому изменению параметров фармакокинетики антибиотика, вводимого в организм с лейкоцитарной взвесью. Так, достоверно увеличивается период полувыведения ($T_{1/2\beta}$), кажущийся объём распределения (V) и площадь под фармакокинетической кривой (AUC), а показатель тотального клиренса (Cl) закономерно снижается.

Таблица 21 - Сопоставление фармакокинетических показателей цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы, присущих интактным животным и животным с моделью абсцесса

Показатель	Интактные животные			Животные с моделью абсцесса			U-критерий Манна-Уитни; p-уровень
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	
$T_{1/2\beta}$	230,1	188,7	296,2	463,76	340,54	698,6	U=4; p=0,005
K_{el}	0,030	0,023	0,037	0,020	0,016	0,024	U=14; p=0,083
V	10,460	9,760	11,510	3,91	2,91	8,44	U=0; p=0,001
Cl	8,211	6,504	8,669	6,211	4,493	6,558	U=10; p=0,030
AUC	16108,3	14330,3	17259,4	50508,5	56237,1	61277,2	U=8; p=0,017

В таблице 22 приведены сравнительные данные фармакокинетики, характеризующие эритроцитарную транспортную систему.

Таблица 22 - Сопоставление фармакокинетических показателей цефтриаксона в составе эритроцитарной транспортной системы, присущих интактным животным и животным с моделью абсцесса

Показатель	Интактные животные			животные с моделированным абсцессом			U-критерий Манна-Уитни; p-уровень
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	
$T_{1/2\beta}$	122,6	113,1	153,8	245,1	226,9	368,6	U=7; p=0,013
K_{el}	0,064	0,045	0,068	0,050	0,040	0,060	U=23; p=0,448
V	7,65	7,51	8,49	5,29	2,63	8,56	U=9; p=0,079
Cl	17,26	15,672	21,422	15,26	13,56	19,31	U=3; p=0,050
AUC	12791,8	11934,0	14620,2	22776,9	15893,9	26883,4	U=0; p=0,001

Для эритроцитарной транспортной системы цефтриаксона характерны принципиально те же особенности фармакокинетики, что и для цефтриаксона в

свободном виде и в лейкоцитарной транспортной системе: удлинение периода полувыведения и площади под фармакокинетической кривой на фоне снижения показателя тотального клиренса.

Как видно, наличие у кроликов очага гнойной инфекции приводит к некоторым изменениям фармакокинетики вводимого внутривенно антибиотика цефтриаксон. Для антибиотика в свободной форме и в форме клеточной транспортной системы – лейкоцитарной или эритроцитарной, меняется фармакокинетика: удлиняется период полувыведения и увеличивается площадь под фармакокинетической кривой при некотором снижении клиренса.

В условиях данного эксперимента возможно прямое сравнение фармакокинетических параметров цефтриаксона при сопоставляемых клеточных транспортных системах – эритроцитарной и лейкоцитарной. Результаты приведены в следующей таблице 23.

Таблица 23 - Фармакокинетические показатели цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы при внутривенном введении и кроликам с моделью очаговой хирургической инфекции

Пара метр	Эритроцитарная система			Лейкоцитарная система			U-критерий Манна-Уитни; p-уровень
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	
$T_{1/2\beta}$	245,1	226,9	368,6	463,76	340,54	698,6	U=4; p=0,005
K_{el}	0,050	0,040	0,060	0,020	0,016	0,024	U=8; p=0,008
V	5,29	2,63	8,56	3,91	2,91	8,44	U=14; p=0,081
Cl	15,26	13,56	19,31	6,211	4,493	6,558	U=10; p=0,030
AUC	22776,9	15893,9	26883,4	50508,5	56237,1	61277,2	U=8; p=0,017

Как видно из представленных данных, за исключением показателя кажущегося объёма распределения во всех остальных случаях получены статистически значимые различия по параметрам фармакокинетики эритроцитарной и лейкоцитарной транспортных систем. Период полувыведения ($T_{1/2\beta}$) и площадь под фармакокинетической кривой (AUC), основные параметры, характеризующие длительность пребывания антибиотика в организме значимо больше в случае использования для цефтриаксона лейкоцитарной транспортной системы, соответственно в 1,9 раза и 2,2 раза. Численные показатели константы элиминации (K_{el}) и тотального клиренса (Cl), характеризующие процесс элиминации введённого препарата из организма в случае использования лейкоцитарной транспортной системы для цефтриаксона существенно ниже таковых присущих эритроцитарной системе, в 2,5 раза и 2,4

раза, соответственно. Все вышеприведённое даёт основание утверждать, что лейкоцитарная транспортная система отличается от эритроцитарной меньшей скоростью элиминации и большей длительностью пребывания антибиотика в организме.

Ещё один важный параметр фармакокинетики антибиотиков, принципиально важный в условиях нашего эксперимента - биодоступность или характеристика препарата переходить из центральной камеры, представленной в данном случае кровью в периферическую камеру, роль которой выполняет очаг воспаления в виде абсцесса мягких тканей. Уровень концентрации антибиотика, создающийся после введения цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы в воспалённой мышце (Медиана = 15,49 мкг/мл), выше уровня концентрации после введения цефтриаксона в составе эритроцитарной транспортной системы (Медиана = 8,916 мкг/мл; $p=0,031$) в 1,7 раза. Аналогичная ситуация наблюдалась и с уровнем концентрации цефтриаксона в гнойном отделяемом из абсцесса: самая высокая концентрация антибиотика (Медиана = 9,795 мкг/мл) создаётся после введения лейкоцитарной системы и на превышает уровень концентрации антибиотика после введения эритроцитарной системы (Медиана = 4,880 мкг/мл; $p=0,016$) практически в 2 раза.

Если исходить из положения, что эффективность антибиотика цефалоспоринового ряда определяется уровнем концентрации препарата в биофазе (очаг инфекции) и длительностью пребывания препарата в организме, то можно утверждать, что фармакокинетика антибиотика цефтриаксона введённого в составе лейкоцитарной транспортной системы по сравнению с вариантом введения в составе эритроцитарной транспортной системы, обеспечивает более оптимальные условия для проявления противомикробного химиотерапевтического эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из аксиом фармакологии и химиотерапии является утверждение о наличии прямой зависимости уровня противомикробной активности антибиотика от уровня концентрации препарата в биофазе (мишень действия антибиотика, очаг микробного воспаления, например в хирургии) [126,127]. Это обстоятельство позволяет рассматривать фармакокинетические константы и параметры как предикторы эффективности антибиотика.

Разработка транспортных систем для целенаправленной доставки антибиотиков в организме к настоящему времени идёт довольно интенсивно и выражается в появлении ряда транспортных систем на фармацевтическом рынке в виде липосом и наночастиц [128].

Разработка клеточных депо антибиотика или клеточных контейнеров для антибиотиков – относительно новая и очевидная тенденция химиотерапии в последнее десятилетие [129-134]. Это направление отличает необходимость приготовления транспортной системы на основе аутологичных клеток *ex tempore*.

При теоретической разработке проблемы клеточного транспорта для лекарственных веществ, в частности для антибиотиков, нами были выявлены предположения В.Е. Вах и соавторами и E.Briones и соавторами [135,136], о том, что клеточные транспортные системы могут принципиальным образом менять фармакокинетику депонированного в них лекарственного средства. Это положение было использовано нами при формировании основной гипотезы работы: аутологичные клеточные транспортные системы в виде эритроцитов и лейкоцитов обеспечивают существенные изменения фармакокинетики депонированного в них антибиотика, изменения фармакокинетики создают основу для пролонгации терапевтического эффекта и обеспечивают направленную доставку противомикробного препарата в очаг воспаления. Основные положения и результаты настоящей работы являются экспериментальными доказательствами данной гипотезы.

Нами была создана опытная партия клеточной транспортной системы на основе лейкоцитов кроликов и опытная партия клеточной транспортной системы на основе эритроцитов кролика. В обоих случаях использовались стандартные методики получения депо антибиотика в лейкоцитах и эритроцитах. Однако для лейкоцитарной транспортной системы дополнительно было проведено доказательство возможности увеличения степени депонирования цефтриаксона в лейкоциты при помощи вспомогательных веществ, потенциально увеличивающих связывание на мембранах и увеличивающих проницаемость мембран [137]. В результате были получены статистически достоверные данные, свидетельствующие, что внесение в среду инкубации антибиотика и клеток 0.5 mM АТФ почти на 80% увеличивает связывание цефтриаксона клеточной массой, преимущественно лейкоцитами. И далее в ходе выполнения эксперимента при приготовлении лейкоцитарной клеточной транспортной системы использовался этот приём с добавлением АТФ. Полученные данные биофармацевтических исследований, проведённые

нами имели своим результатом данные по связыванию антибиотика в транспортной системе, степени его диссоциации из клеток и стабильности на протяжении суток после изготовления. Полученные характеристики для эритроцитарной транспортной системы: связывание более 60%, диссоциация за сутки – полная, более 80% в достаточной степени согласуются с ранее известными характеристиками «фармакоцитов» (эритроцитарные тени, содержащие лекарственный препарат), описанными Ж.Ш. Жумадиловым и соавторами [68, с.55; 74, с.15]. Биофармацевтические характеристики лейкоцитарной транспортной системы для антибиотика цефтриаксон – связывание около 30%, высвобождение за 24 часа более 60%, полученные нами в настоящей работе в доступной литературе нами не обнаружены. Имеющиеся данные относительно связывания лекарственных препаратов иного происхождения, не антибиотиков, принципиально похожи (например интерферона) [138]. Следует заметить, что при каждом получении транспортной системы (для каждого кролика, взятого в эксперимент транспортная система изготавливалась из аутологичных клеток крови) контролировался уровень концентрации антибиотика в супернатанте после финальной инкубации, по убыли препарата рассчитывали связывание и таким образом, стандартизовали вводимую дозу.

Работа проведена в два этапа. Первоначально были определены основные фармакокинетические параметры антибиотика цефтриаксон при внутривенном однократном его введении интактным, здоровым кроликам в свободной форме, а в форме депо в аутологичных лейкоцитах и депо в аутологичных эритроцитах в дозе 500 мг.

Фармакокинетические кривые «концентрация-время» характеризующие поведение цефтриаксона в сыворотке крови кроликов после внутривенного введения в составе клеточных контейнеров, как лейкоцитарных, так и эритроцитарных отличаются от кривой после введения свободного препарата сниженным уровнем концентрации в первые 2 часа после введения и более высоким уровнем в последующее время. Максимум концентрации после введения лейкоцитарных и эритроцитарных контейнеров создаётся в период между 2 и 3 часами, а при введении свободного препарата максимум создаётся сразу после введения. Длительность пребывания цефтриаксона в крови после введения свободного препарата ограничена в условиях нашего наблюдения и составляет менее 12 часов, после введения цефтриаксона в составе эритроцитарной системы составляет около 16 часов и после введения в составе лейкоцитарной системы – более 24 часов.

Как установлено нами, транспортные клеточные системы пролонгируют время нахождения цефтриаксона в организме кроликов, обеспечивая постепенное высвобождение препарата из клеточных контейнеров. Эта особенность клеточных транспортных систем предполагалась теоретически [139] иона, в принципе, отражает общий принцип функционирования большинства транспортных систем для антибиотиков (липосомы, наночастицы) [140-142].

Рассчитанные в пределах компартментных фармакокинетических моделей параметры более точно описывают фармакокинетику цефтриаксона. Для лейкоцитарной транспортной системы нам удалось показать рост периода полувыведения и кажущегося объёма распределения, что очевидно связано с уменьшением константы элиминации и тотального клиренса. Как следствие этих изменений, при данном способе введения увеличивается интегральная площадь под кривой «концентрация – время». Для эритроцитарной транспортной системы установлен рост периода полувыведения, увеличение объёма распределения, что может быть обусловлено уменьшением константы элиминации.

Для эритроцитарной и лейкоцитарной транспортной системы цефтриаксона в условиях настоящего эксперимента, при внутривенном введении интактным кроликам, общим является удлинение периода полувыведения, снижение константы элиминации и увеличение объёма распределения. Статистически значимые отличия между клеточными транспортными системами удалось установить по примеру периода полувыведения: для лейкоцитарной системы он больше, чем для эритроцитарной.

Фармакокинетические характеристики, полученные в условиях нашего эксперимента, описаны впервые для клеточных транспортных форм, но напоминают известные характеристики для полимерных транспортных систем, установленные рядом авторов, например [143].

Вероятность именно подобных сдвигов фармакокинетики при использовании систем направленного транспорта предполагались рядом авторов в последние годы, но конкретные фармакокинетические характеристики в доступной литературе не были описаны для клеточных транспортных систем, а лишь для наночастиц.

Установленные изменения фармакокинетики, гипотетически могут изменить выраженность эффекта антибиотика, поскольку антимикробная активность антибиотиков детерминруется уровнем концентрации и временем удержания терапевтического диапазона концентрации в биофазе процесса, например в очаге воспаления. Внутривенное введение антибиотиков в форме клеточного депо должно обеспечить за счёт изменения фармакокинетики относительно избирательное накопление препарата в месте действия. Дальнейшие исследования фармакокинетики антибиотиков на модели очаговой инфекции призваны подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

Модель очаговой гнойной хирургической инфекции представляла собой абсцесс мягких тканей у кролика. Как и в случае с интактными животными были определены основные фармакокинетические параметры цефтриаксона после внутривенного однократного введения в свободной форме, в форме депо в аутологичных лейкоцитах и эритроцитах.

Фармакокинетическая кривая «концентрация - время» при любом способе введения кроликам с моделью очаговой инфекции напоминал на аналогичную кривую после введения интактным кроликам. После введения цефтриаксона в клеточных контейнерах первые 2-3 часа антибиотик высвобождаясь из клеток,

постепенно достигал максимума и потом следовал период элиминации до 24 часов. Однако в этом случае препарат введённый в эритроцитарной системе удерживался в крови существенно дольше, чем у интактных кроликов.

Статистически значимые изменения фармакокинетических параметров установлены при внутривенном введении цефтриаксона в лейкоцитарной, равно, как и эритроцитарной транспортной системе: достоверно увеличивается период полураспределения, период полувыведения при снижении константы элиминации. Для лейкоцитарной транспортной системы дополнительно выявлено, что достоверно снижается тотальный клиренс и растёт значение площади под фармакокинетической кривой. Различия в фармакокинетике цефтриаксона в лейкоцитарной транспортной системе и эритроцитарной транспортной системе сводились к большей площади под фармакокинетической кривой на фоне снижения константы элиминации.

Для иллюстрации полученных нами параметров фармакокинетики цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы мы совместно с сотрудниками NLA Назарбаев Университета провели пилотный проект по оценке распределения высокомолекулярного флуорохрома Alexa Fluor 680, включённого в состав лейкоцитарной транспортной системы по методике, аналогичной той, которую использовали для включения в лейкоциты цефтриаксона. Полученные графические данные совершенно определённо демонстрируют пролонгацию времени пребывания в организме субстрата, включённого в лейкоциты по сравнению со свободным препаратом.

Поскольку основной интерес для противомикробной химиотерапии представляет уровень концентрации антибиотика в биофазе. В условиях нашего эксперимента биофазой процесса можно считать ткани, входящие в абсцесс мягких тканей – собственно гнойное содержимое абсцесса и прилегающие к гнойному очагу воспалённые участки мышечной ткани.

Результаты определения концентрации антибиотика в мышечной ткани из зоны абсцесса через 24 часа после введения существенно различался во всех экспериментальных группах. Самая высокая концентрация наблюдалась в случае лейкоцитарного транспорта антибиотика, меньшая концентрация создавалась в мышцах после введения эритроцитарных контейнеров с цефтриаксоном и после внутривенном введении свободного препарата. Аналогичная ситуация наблюдалась и с концентрациями цефтриаксона в гнойном отделяемом из абсцесса через 24 часа после его внутривенного введения в разных лекарственных формах: при лейкоцитарном транспорте наблюдалась самая высокая концентрация антибиотика и она статистически значимо отличалась от таковой в очаге инфекции при эритроцитарном транспорте и при внутривенном введении свободного препарата. Считаем необходимым указать, что нам не удалось определить статистически достоверно различия в уровне концентрации цефтриаксона, создающийся в гное после введения эритроцитарных контейнеров и введении свободного препарата. В этом случае преимущество лейкоцитарной транспортной системы для цефтриаксона перед вариантом введения препарата в составе эритроцитарной транспортной системы выглядит очевидным. Можно считать,

что выявленный рост концентрации цефтриаксона в воспалённых тканях (биофазе) при введении препарата в транспортной лейкоцитарной системе является отражением зафиксированного нами в этом случае увеличения периода полураспределения. Есть основания предполагать, что накопление антибиотика в воспалённых тканях является следствием феномена направленного транспорта антибиотика с помощью клеточной системы.

Отдельно рассматривалась вероятность изменения типичной фармакокинетики цефтриаксона, описанной на интактных животных, при моделировании гнойного очага в виде абсцесса мягких тканей.

Установлено, что, наличие у кроликов очага гнойной инфекции сказывается на количественных характеристиках параметров фармакокинетики цефтриаксона. Причём, фармакокинетика для антибиотика в свободной форме и в форме клеточной транспортной системы – лейкоцитарной или эритроцитарной, меняется однотипно: удлиняется период полувыведения и увеличивается площадь под фармакокинетической кривой при некотором снижении клиренса. Сходные сдвиги фармакокинетики антибиотиков были установлены ранее для гентамицина после внутривенного введения на фоне гнойного перитонита у крыс [144] для азитромицина при моделировании абсцесса лёгких у кроликов [145]. Есть некоторые основания считать, что выявленные изменения фармакокинетики могут быть типичными антибиотиков при наличии в организме очага микробного воспаления. Вероятное объяснение данного феномена, может быть связано с изменениями кровотока в фокусе воспалительной зоны и следующего за этим, изменения распределения антибиотика. Но значительно больший уровень накопления цефтриаксона в очаге воспаления при введении в составе лейкоцитарной транспортной системы, по сравнению с вариантом введения свободного препарата (в 3 раза) и препарата, депонированного в эритроцитах (в 1,5 раза), позволяет обосновать возможность активного транспорта антибиотика с лейкоцитами в очаг воспаления. Такое перераспределение антибиотика в организме после введения в составе лейкоцитарной системы полностью соответствует феномену направленной доставки или направленного транспорта.

В целом, подобные изменения в параметрах фармакокинетики лекарственных препаратов при использовании транспортных систем предполагалась рядом авторов в последние годы, и это явление получило определение как направленный транспорт или направленная доставка препаратов, но конкретные характеристики были описаны лишь для наночастиц [146]. Выявленные нами в ходе выполнения настоящей работы изменения фармакокинетики цефтриаксона, могут также считаться проявлением направленного транспорта антибиотика и могут изменить выраженность эффекта, поскольку антимикробная активность антибиотиков определяется уровнем концентрации и временем сохранения терапевтического диапазона концентрации в очаге воспаления. Введение цефтриаксона в форме лейкоцитарной транспортной системы и эритроцитарной транспортной системы (в несколько меньшей степени) обеспечивают, за счёт изменения их фармакокинетики, относительно избирательное накопление препарата в месте

действия, что и является реализацией феномена направленного транспорта. Некоторое преимущество лейкоцитарной транспортной системы, выражающееся в изменении параметров фармакокинетики потенциально обеспечивающих возможность большей пролонгации терапевтического эффекта и увеличении выраженности антимикробного терапевтического эффекта ввиду большего накопления антибиотика в очаге микробного воспаления, должно найти дальнейшее подтверждение в клинических исследованиях.

Таким образом, результаты настоящего исследования можно считать доказательствами гипотезы о том, что клеточные транспортные системы могут менять фармакокинетические свойства для инкапсулированного лекарственного вещества и обеспечивать селективное распределение лекарственного средства с преимущественным накоплением в тканях ретикуло-эндотелиальной системы (RES) или в местах скопления клеток, способных к фагоцитозу (абсцессах, гнойных очагах и т.д.).

Выводы

1. При инкубации *invitro* антибиотика цефтриаксон с теньями эритроцитов связывается до 70% от внесённой дозы и в течение 24 часов происходит диссоциации во внеклеточное пространство более 80% препарата от ранее связанного. При инкубации *invitro* антибиотика цефтриаксон с лейкоцитарной клеточной массой связывается $15,6 \pm 4,1\%$ препарата от внесённой дозы, в присутствии 0.5 mM АТФ связывание увеличивается до $28,5 \pm 2,7\%$ и в течение 24 часов показатель диссоциации составляет более 60%.

2. Особенности фармакокинетики цефтриаксона в составе эритроцитарной транспортной системы по сравнению с фармакокинетикой свободного препарата при внутривенном введении интактным кроликам являются: снижение численного значения константы элиминации (K_{el}) и увеличение кажущегося объёма распределения (V) при тенденции снижения тотального клиренса (Cl), увеличения периода полувыведения ($T_{1/2}$) и площади под фармакокинетической кривой (AUC).

3. Особенности фармакокинетики цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы по сравнению с фармакокинетикой свободного препарата при внутривенном введении интактным кроликам являются: снижение значений константы элиминации (K_{el}), тотального клиренса (Cl), при повышении кажущегося объёма распределения (V), увеличении периода полувыведения (увеличение $T_{1/2}$ в 1,9 раза) и площади под фармакокинетической кривой (увеличение AUC в 1,5 раза).

4. Фармакокинетика цефтриаксона в составе эритроцитарной транспортной системы у кроликов с моделью очаговой хирургической инфекции характеризуется: сниженным пиком в сыворотке крови, более медленным распределением из центральной камеры в периферическую, увеличением $T_{1/2}$ (в 2 раза), AUC и MRT (на 27-30%), при сниженном Cl и K_{el} и неизменном V . Цефтриаксон при введении в составе эритроцитарной транспортной системы накапливается в очаге воспаления, создавая более высокую, по сравнению с вариантом введения свободного препарата, концентрацию в воспалённой

мышечной ткани. Накопление цефтриаксона в очаге воспаления (гной и окружающая мышечная ткань) увеличивается по сравнению с вариантом введения свободного препарата (F возрастает с 0,03 до 0,09 для мышечной ткани и тенденция увеличения F для гноя - с 0,04 до 0,05).

5. Фармакокинетика цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы у кроликов с моделью очаговой хирургической инфекции характеризуется: сниженным пиком в сыворотке крови, более медленным распределением из центральной камеры в периферическую, увеличением $T_{1/2}$, AUC и MRT (в 3-5 раз), при сниженном Cl и Kel (в 3 раза) и неизменном V . Накопление цефтриаксона в очаге воспаления (гной и окружающая мышечная ткань) увеличивается (F возрастает с 0,03 до 0,13 для мышц и с 0,04 до 0,08 для гноя) по сравнению с вариантом введения свободного препарата.

6. При включении антибиотика цефтриаксон как в эритроцитарную транспортную систему, так и в лейкоцитарную транспортную систему выявляются односторонние изменения фармакокинетических показателей: пролонгация пребывания препарата в организме (повышение $T_{1/2}$, AUC и MRT и снижение Cl и Kel), а также повышенное накопление в очаге гнойного воспаления. При однонаправленности изменений фармакокинетики различие между клеточными транспортными системами выражается в более высоких значениях $T_{1/2}$, AUC (в 1,9 и 2,2 раза, соответственно) и более высоких значениях F (в 1,5 раза) для лейкоцитарной транспортной системы.

7. Лейкоцитарная транспортная система для антибиотиков по параметрам фармакокинетики может считаться более перспективной по сравнению с эритроцитарной клеточной транспортной системой, поскольку введение цефтриаксона в составе лейкоцитарной транспортной системы обеспечивает более высокий уровень концентрации антибиотика в очаге воспаления и удержание его в течение более длительного времени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При планировании клинических исследований транспортных систем для целенаправленной доставки антибиотиков на основе аутологичных клеток крови и разработке дозового режима рекомендуется ориентироваться на количественные значения основных фармакокинетических констант - $T_{1/2}$ и AUC.

2. При внедрении в клинику клеточных транспортных систем рекомендуется учитывать вероятность накопления большей концентрации препарата в воспалительном очаге при использовании лейкоцитарного транспорта антибиотиков.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Kalia Y.N., Perozzo R., Scapozza L. The pharmaceutical biochemistry group: where pharmaceutical chemistry meets biology and drug delivery // *Chimia (Aarau)*. – 2012. - №66(5). – P. 313-319.
- 2 Allémann E., Delie F., Lange N. Pharmaceutical technology at the service of targeted drug delivery // *Chimia (Aarau)*. - 2012. - №66(5). – P. 308-312.
- 3 Jeong K.J., Kohane D.S. Surface modification and drug delivery for bio integration // *Ther Deliv.* – 2011. - №2(6),Jun. – P. 737-752.
- 4 Rodriguez-Devora J.I., Ambure S., Shi Z.D., Yuan Y., Sun W., Xui T. Physically facilitating drug-delivery systems // *Ther Deliv.* – 2012. - №3(1),Jan. – P. 125-139.
- 5 Whittam A.J., Maan Z.N., Duscher D., Wong V.W., Barrera J.A., Januszyk M., Gurtner G.C. Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2016. - № 5(2),Feb. - P. 79-88.
- 6 Gutiérrez M.C., Colino Gandarillas C.I., Sayalero Marinero M.L., Lanao J.M. Cell-based drug-delivery platforms // *Ther Deliv.* – 2012. - №3(1),Jan. - P. 25-41.
- 7 Kirtane A.R., Langer R., Traverso G. Past, Present, and Future Drug Delivery Systems for Antiretrovirals // *J. Pharm. Sci.* – 2016. - №105(12),Dec. – P. 3471-3482.
- 8 Millán C.G., Marinero M.L., Castañeda A.Z., Lanao J.M. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers // *J. Control Release.* – 2004. - № 95(1), Feb. – P. 27-49.
- 9 Magnani M, Pierigè F, Rossi L. Erythrocytes as a novel delivery vehicle for biologics: from enzymes to nucleic acid-based therapeutics // *Ther Deliv.* – 2012. – № 3(3). – 405-414.
- 10 Генинг Т.П., Колкер И.И., Жумадилов Ж.Ш. Использование форменных элементов крови для направленной доставки химиотерапевтических и диагностических препаратов в очаг поражения // *Антибиотики и химиотерапия.* – 1988. - №11. - С. 867-871.
- 11 Provotorov V.M., Ivanova G.A. The role of erythrocytes in the system of controlled transport of pharmaceutical agents // *Klin. Med.* - 2009. - № 87 (9). – P. 4-8.
- 12 Мовшев Б.Е., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И. Трансфузионные среды: перспективы // *Новое в трансфузиологии.* – 2006. - Вып. 28. - С. 39-40.
- 13 Гуляев А.Е., Жаугашева С.К., Ермекбаева Б.А., Пивень Л.И., Юсифов З.А. Направленный транспорт лекарственных средств – многолетний приоритет в научной работе Сергея Викторовича Лохвицкого // *Медицина и экология.* – 2015. - №1. – С. 58-60.
- 14 Huang W.C., Lu I.L., Chiang W.H., Lin Y.W., Tsai Y.C., Chen H.H., Chang C.W., Chiang C.S., Chiu H.C. Tumor tropic adipose-derived stem cells carrying smart nanotherapeutics for targeted delivery and dual-modality therapy of orthotopic glioblastoma // *J. Control Release.* – 2017. - № 21(254). – P. 119-130.

- 15 Pang L., Zhang C., Qin J., Han L., Li R., Hong C., He H., Wang J. A novel strategy to achieve effective drug delivery: exploit cells as carrier combined with nanoparticles // *Drug Deliv.* – 2017. - № 24(1), Nov. – P. 83-91.
- 16 Bax B.E., Bain M.D., Talbot P.J. et al. Survival of carrier erythrocytes in vivo // *Clin. Sci.* - 1999. – №96. – P. 171-178.
- 17 Briones E., Colino C.I., Millán C.G., Lanao J.M. Increasing the selectivity of amikacin in rat peritoneal macrophages using carrier erythrocytes // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2009. - №38(4). – P. 320-324.
- 18 Rossi L., Serafini S., Pierigé F., Antonelli A., Cerasi A., Fraternale A., Chiarantini L., Magnani M. Erythrocyte-based drug delivery // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2005. - №2(2), Mar. – P. 311-322.
- 19 Gutiérrez Millán C., Zarzuelo Castañeda A., González López F., Sayalero Marinero M.L., Lanao J.M. Pharmacokinetics and biodistribution of amikacin encapsulated in carrier erythrocytes // *J. Antimicrob Chemother.* – 2008. – №61(2). – P. 375-381.
- 20 Генинг Т.П., Белозерова Л.А. Эритроцитарные носители в направленном транспорте лекарств в гепатологии. - Ульяновск: УлГУ, 2006. - 79 с.
- 21 Черний В.И., Колесников А.Н., Кузнецова И.В., Шраменко Е.К., Логвиненко Е.Л. Экстракорпоральная антибиотикотерапия // «Новости медицины и фармации» антимикробная терапия (тематический номер). – 2009 // <http://www.mif-ua.com/archive/article/7854>.
- 22 Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Направленный транспорт лекарств: проблемы и перспективы // *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева.* - 1987. - Т.32, №5. - С. 485-487.
- 23 Бегдуллаев А.К., Маншарипова А.Т., Джусипов А.К. и др. Проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике // *Терапевтический вестник.* - 2008. - Т.17, №1. - С. 32-36.
- 24 Сипливая Л.Е., Ласкова И.Л., Шевцова Е.М., Костебелов Н.В., Шульга Т.А., Рудская В.И. Иммуномодулирующая активность некоторых аминогликозидов, введенных в эритроцитарных носителях // *Труды 4-го Рос.нац. конгресса «Человек и лекарство»* - 1994. - С. 98-100.
- 25 Venuta A., Wolfram J., Shen H., Ferrari M. Post-nano strategies for drug delivery: Multistage porous silicon microvectors // *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* – 2017. - №5(2), Jan. – P. 207-219.
- 26 Malatesta M., Galimberti V., Cisterna B., Costanzo M., Biggiogera M., Zancanaro C. Chitosan nanoparticles are efficient carriers for delivering biodegradable drugs to neuronal cells // *Histochem Cell Biol.* – 2014. - №141(5). – P. 551-558.
- 27 Bangham A.D., Horne R.W. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface agents as observed in the electron microscope // *J. Mol. Biol.* - 1964. - Vol.8. - P. 660-668.
- 28 Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Leporatti S. et al. Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* - 2002. - Vol.198-200. - P. 535-541.

- 29 Барсуков Л.И. Липосомы // Известия Коми научного центра УрО РАН. – Сыктывкар, 2012. – Вып. 1(9). – С. 54-61.
- 30 Rip J. Liposome technologies and drug delivery to the CNS // Drug Discov. Today Technol. – 2016. – №20. – P. 53-58.
- 31 Joraholmen M.W., Basnet P., Acharya G., Škalko-Basnet N. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2017. – №113, Apr. – P. 132-139.
- 32 Perez-Lopez M.E., Curiel T., Gomez J.G., Jorge M. Role of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in the treatment of relapsing ovarian cancer // Anticancer Drugs. – 2007. – Vol.18, №5. – P. 611-617.
- 33 Kazakov S., Levon K. Liposome-nanogel structures for future pharmaceutical applications // Curr. Pharm. Des. – 2006. – №12(36). – P. 4713-4728.
- 34 Lee J., Goh U., Lee H.J., Kim J., Jeong M., Park J.H. Effective Retinal Penetration of Lipophilic and Lipid-Conjugated Hydrophilic Agents Delivered by Engineered Liposomes // Mol Pharm. – 2017. – №14(2). – P. 423-430.
- 35 Chang T.M. Biodegradable semipermeable microcapsules containing enzymes, hormones, vaccines and other biologicals // J. Bioengineering. – 1976. – Vol.1, №1. – P. 25-32.
- 36 Onishi H., Machida Y. Macromolecular and nanotechnological modification of camptothecin and its analogs to improve the efficacy // Curr. Drug Discov. Technol. – 2005. – № 2(3). – P. 169-183.
- 37 Sánchez-Purrà M., Ramos V., Petrenko VA, Torchilin VP, Borrós S. Double-targeted polymersomes and liposomes for multiple barrier crossing // Int J. Pharm. – 2016. – №511(2). – P. 946-956.
- 38 Gunay M.S., Ozer A.Y., Chalon S. Drug Delivery Systems for Imaging and Therapy of Parkinson's Disease // Curr Neuropharmacol. – 2016. – №14(4). – P. 376-391.
- 39 Uhl P., Pantze S., Storck P., Parmentier J., Witzigmann D., Hofhaus G., Huwyler J., Mier W., Fricker G. Oral delivery of vancomycin by tetraether lipid liposomes // Eur J. Pharm. Sci. – 2017. – №14. – P. 30412-30418.
- 40 Dugan L.L., Turetsky D.M., Du C. et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents // Pros. Natl. Acad. Sci. – 1997. – Vol.94, №17. – P. 9434-9439.
- 41 Dutta R.C. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress. Curr. Pharm. Des. – 2007. – №13(7). – P. 761-769.
- 42 Костюченко А.Л. Эфферентная терапия. – СПб.: Фолиант, 2000. – 432 с.
- 43 El-Say KM, El-Sawy HS. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery // Int. J. Pharm. – 2017. – №528(1-2), Jun. – P. 675-691.
- 44 Fathi M., Barar J. Perspective highlights on biodegradable polymeric nanosystems for targeted therapy of solid tumors // Bioimpacts. – 2017. – №7(1). – P. 49-57.
- 45 Wang Y.F., Liu L., Xue X., Liang X.J. Nanoparticle-based drug delivery systems: What can they really do in vivo? // F1000Res. – 2017. – №6. – P. 681-681.
- 46 Rijt S., Habibovic P. Enhancing regenerative approaches with nanoparticles // J. R. Soc. Interface. – 2017. – №14(129). – P. 1-10.

- 47 Radovic-Moreno A.F., Lu T.K., Puscasu V.A., Yoon C.J., Langer R., Farokhzad O.C. Surface chargeswitching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics // *ACS Nano*. – 2012. - №6. – P. 4279-4287.
- 48 Lin Y-H., Chang C-H., Wu Y-S., Hsu Y-M., Chiou S-F., Chen Y-J. Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-helicobacter pylori therapy // *Biomaterials*. – 2009. - №30. – P. 3332-3342.
- 49 Gao W., Thamphiwatana S., Angsantikul P., Zhang L. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. – 2014. - №6(6). – P. 532-547.
- 50 Park S.C., Kim N.H., Yang W., Nah J.W., Jang M.K., Lee D. Polymeric micellar nanoplatfoms for Fenton reaction as a new class of antibacterial agents // *J. Control Release*. – 2016. - №221. – P. 37-47.
- 51 Liu Y., Busscher H.J., Zhao B., Li Y., Zhang Z., Mei H.C. et al. Surface-adaptive, antimicrobially loaded, micellar nanocarriers with enhanced penetration and killing efficiency in staphylococcal biofilms // *ACS Nano*. - 2016. - №10(4). – P. 4779-4789.
- 52 Xie S., Yang F., Tao Y., Chen D., Qu W., Huang L. et al. Enhanced intracellular delivery and antibacterial efficacy of enrofloxacin-loaded docosanoic acid solid lipid nanoparticles against intracellular salmonella // *Sci. Rep.* – 2017. - №7(3). – P. 81-88.
- 53 Bazzaz B.S.F., Khameneh B., Zarei H., Golmohammadzadeh S. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus Epidermidis* biofilm // *Microb. Pathog.* – 2016. - №93. – P. 137-144.
- 54 Geilich B.M., Gelfat I., Sridhar S., Ven A.L., Webster T.J. Superparamagnetic iron oxide-encapsulating polymersome nanocarriers for biofilm eradication // *Biomaterials*. – 2017. - №119. – P. 78-85.
- 55 Kalita S., Kandimalla R., Sharma K.K., Kataki A.C., Deka M., Kotoky J. Amoxicillin functionalized gold nanoparticles reverts MRSA resistance // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2016. - №61. – P. 720-727.
- 56 Lee B.Y., Li Z., Clemens D.L., Dillon B.J., Hwang A.A., Zink JI. et al. Redox-triggered release of moxifloxacin from mesoporous silica nanoparticles functionalized with disulfide snap-tops enhances efficacy against pneumonic tularemia in mice // *Small*. – 2016. - №12(27). – P. 3690-3702.
- 57 Ahmed A., Khan A.K., Anwar A., Ali S.A., Shah M.R. Biofilm inhibitory effect of chlorhexidine conjugated gold nanoparticles against *Klebsiella Pneumoniae* // *Microb. Pathog.* – 2016. - №98. – P. 50-56.
- 58 Zaidi S., Lama M., Asad U.K. Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era // *Nanomedicine: NBM*. - 2017 // <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.015>.
- 59 Бегдуллаев А.К., Маншарипова А.Т., Джусипов А.К. и др. Проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике // *Терапевтический вестник*. - 2008. - Т.17, №1. - С. 32–36.
- 60 Абу Идда А.Ш., Горелов С.И., Каган О.Ф. Лечение больных с гнойно-воспалительными заболеваниями почек путем применения направленного транспорта антибактериальных препаратов в аутологичных лейкоцитах //

Медицинский научный и учебно-методический журнал. - 2006. - №31. - С. 116-124.

61 Bazzaz B.S.F., Khameneh B., Zarei H., Golmohammadzadeh S. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus Epidermidis* biofilm // *Microb. Pathog.* – 2016. - №93. – P. 137-144.

62 Генинг Т.П., Белозерова Л.А. Эритроцитарные носители в направленном транспорте лекарств в гепатологии. - Ульяновск: УлГУ, 2006. - 79 с.

63 Самохин Г.П., Домогатский С.П. Направленный транспорт лекарств с помощью эритроцитов // *Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева.* - 1987. - Т.32, №5. - С. 527-533.

64 Сарбаш В.И., Тихонова А.Г., Вуймо Т.А. и др. Эритроциты – носители лекарственных препаратов // *Российский химический журнал.* - 2007. - Т. 51, № 1. - С. 143-149.

65 Tajerzadeh H., Hamidi M. Evaluation of the hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in human intact erythrocytes // *Drug Devel. Ind. Pharm.* - 2000. - №26. – P. 1247-1257.

66 Rossi L., Serafini S., Magnani M. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting // http://www.landesbioscience.com/pdf/01_Magnani.pdf

67 Кузнецова С.А., Орецкая Т.С. Нанотранспортные системы адресной доставки нуклеиновых кислот в клетки // *Российские нанотехнологии.* - 2010. - Т.5, №9-10. - С. 40-52.

68 Жумадилов Ж.Ш., Макаренко Р.В. Особенности включения некоторых антибиотиков в эритроцитарные тени – систему целенаправленной доставки химиотерапевтических препаратов // *Антибиотики и химиотерапия.* - 1990. - Т.35, №1. - С. 54-56.

69 Ершов А.Л., Карпушина И.А. Опыт применения модифицированной методики направленного транспорта антибиотиков при тяжелом течении внебольничной пневмонии // *Эфферентная терапия.* - 2006. - Т.12, №3. - С. 39-44.

70 Левин И.Г., Фадеев Б.М., Камалов Е.Х. Эритроцитарные носители антигипоксантов и ингибиторов протеолиза в комплексной терапии гепаторенального синдрома // *Тезисы докладов и сообщений VI Всероссийского съезда анестезиологов и реаниматологов.* - М., 1998. - С. 18-22.

71 Генинг Т.П., Колкер И.И., Жумадилов Ж.Ш. Использование форменных элементов крови для направленной доставки химиотерапевтических и диагностических препаратов в очаг поражения // *Антибиотики и химиотерапия.* - 1988. - №11. - С. 867-871.

72 Генинг Т.П., Мануйлов К.К. Фармакокинетика антибиотика, вводимого в организм в клеточных носителях // *Антибиотики и химиотерапия.* – 1991. – №9. – С. 19-20.

73 Lewis D.A., Alpar H.O. Therapeutic possibilities of drugs encapsulated in erythrocytes // *Int. J. Pharm.* - 1984. - Vol.22. - P. 137-146.

- 74 Жумадилов Д.Ш. Эритроцитарные фармакоциты в комплексном лечении больных острым панкреатитом и холецистопанкреатитом // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Астана, 1998. – 26 с.
- 75 Тайгулов Е.А., Жумадилов Ж.Ш., Мукажанов А.К. Эритроцитарные фармакоциты в гепатобилиарной хирургии. – Алматы: Мед.таспасы, 2002. – 20 с.
- 76 Hamidi M., Zarrin A., Foroozesh M., Mohammadi-Samani S. Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals // J. Control Release. – 2007. №118(2). – P. 145-160.
- 77 Tram N.D.T., Ee P.L.R. Macromolecular Conjugate and Biological Carrier Approaches for the Targeted Delivery of Antibiotics // Antibiotics (Basel). – 2017. – №6(3). – P. 1-19.
- 78 Harisa G.I., Badran M.M., Alanazi F.K. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach: Erythrocyte nanovesicles // Saudi Pharm. J. – 2017. – №25(1). – P. 8-17.
- 79 Лохвицкий С.В., Гуляев А.Е., Зубцов Н.В. и др. Клиническая фармакокинетика антибиотиков при введении их в клеточной массе во время плазмафереза // Здоровоохранение Казахстана. – 1992. – №8. – С. 22-24.
- 80 Лохвицкий С.В., Кивман Г.Я., Гуляев А.Е., Пьянов С.Г., Губенко Л.В., Зубцов В.Н. Способ лечения хирургической инфекции // Информационный листок КазгосИНТИ. – Караганда – 1996. – №46. – С. 4-5.
- 81 Гуляев А.Е., Лохвицкий С.В. Лейкоцитарный транспорт антибиотиков. Сообщение 1. Возможности депонирования антибиотиков в лейкоциты // Медицина и экология. – 1996. – №1. – С. 41-44.
82. Лохвицкий С.В., Гуляев А.Е. Лейкоцитарный транспорт антибиотиков. Сообщение 2. Клинические аспекты направленной доставки антибиотиков // Медицина и экология. – 1996. – №1. – С. 45-47.
- 83 Швецов Д.А. Направленный транспорт антибиотиков в лечении острых неспецифических воспалительных заболеваний легких и плевры: автореф. ... канд. мед. наук. – Караганда, 1996. – 22 с.
- 84 Лохвицкий С.В., Ержанова Ш.А., Балаболкин М.И., Сарафанова И.М. Направленный транспорт антибиотиков при лечении больных диабетической гнойной остеоартропатией // Сахарный диабет. – 1999. – №3(4). – С. 40-42.
- 85 Шевцова О.М., Денисова О.И. Применение плазмафереза в сочетании с экстракорпоральной инкубацией эритроцитарной массы с антибактериальными препаратами // Труды 9-ой конференции Московского общества гемафереза. – М., 2001. – С. 26-31.
87. Бельских А.Н., Потапчук В.Б., Лукин В.В., Плоцкий А.Н., Соколов А.А., Стрельникова О.Ю., Суборова Т.Н. Применение "антибактериального удара" в составе предперфузионной подготовки к операциям экстракорпоральной детоксикации в лечении хирургической инфекции // Эфферентная терапия. – 2003. – Т.9, №1. – С. 57-58.
- 88 Бельских А.Н., Потапчук В.Б., Лукин В.В., Плоцкий А.Н., Соколов А.А., Стрельникова О.Ю. Применение экстракорпоральной антибактериальной

фармакотерапии у больных с хирургической инфекцией // Эфферентная терапия. - 2003. – Т.9, №1. - С. 55-56.

89 Самохин Г.П., Домогатский С.П. Направленный транспорт лекарств с помощью эритроцитов // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. - 1987. - Т.32, №5. - С. 527-533.

90 Самохин Г.П., Домогацкий С.П. Направленный транспорт лекарств с помощью эритроцитов // Известия Коми научного центра УрО РАН. - 2012. - №1(9). - С. 46-55.

91 Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Направленный транспорт лекарств: проблемы и перспективы // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. - 1987. - Т.32, №5. - С. 485-487.

92 Букреева Т.В., Парахонский Б.В., Скиртач А.Г. и др. Получение полиэлектролитных микро- капсул с наночастицами серебра и золота в оболочке и дистанционное разрушение таких капсул воздействием лазерного излучения // Кристаллография. - 2006. - Т.51, №5. - С. 183-189.

93 Гущин И.С., Лесков В.П., Прозоровский Н.С., Писарев В.М. Экспериментальное обоснование экстракорпоральной иммунофармакотерапии // Актуальные вопросы иммунофармакотерапии. - М., 1987. - С. 71-82.

94 Сарбаш В.И., Тихонова А.Г., Вуймо Т.А. и др. Эритроциты – носители лекарственных препаратов // Российский химический журнал. - 2007. - Т.51, №1. - С. 143-149.

95 Карпушина И.А., Стеблева Т.Ф., Бонитенко Е.Ю. Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике (обзор литературы) // Российский биомедицинский журнал. - 2004. - Т. 5. - С. 404-408.

96 Провоторов В.М., Иванова Г.А. Роль и место эритроцитов в системе направленного транспорта различных фармакологических средств // Клиническая медицина. - 2009. - №9. - С. 4-8.

97 Костюченко А.Л. Эфферентная терапия. - СПб.: Фолиант, 2000. - 432 с.

98 Останин А.А., Черных Е.Р. Ронколейкин в иммунопрофилактике постхирургических инфекций. - Новосибирск, 2005. - 31 с.

99 Gutiérrez Millán C., Colino Gandarillas C.I., Sayalero Marinero M.L., Lanao J.M. Cell-based drug-delivery platforms // Ther Deliv. – 2012. - №3(1), Jan. – P. 25-41.

100 Millán C.G., Marinero M.L., Castañeda A.Z., Lanao J.M. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers // J. Control Release. – 2004. - № 95 (1), Feb. – P. 27-49.

101 Magnani M., Pierigè F., Rossi L. Erythrocytes as a novel delivery vehicle for biologics: from enzymes to nucleic acid-based therapeutics // Ther Deliv. – 2012. - №3(3), Mar. - P. 405-414.

102 Hamidi M., Zarrin A.H., Foroozesh M., Zarei N., Mohammadi-Samani S. Preparation and in vitro evaluation of carrier erythrocytes for RES-targeted delivery of interferon-alpha 2b // Int. J. Pharm. – 2007. - №341(1-2). – P. 125-133.

- 103 Sternberg N., Georgieva R., Duft K., Bäuml H. Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs // J. Microencapsul. – 2012. - №29(1). – P. 9-20.
- 104 Luo R., Mutukumaraswamy S., Venkatraman S.S., Neu B. Engineering of erythrocyte-based drug carriers: control of protein release and bioactivity // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2012. - №23(1). – P. 63-71.
- 105 Hu C.M., Zhang L., Aryal S., Cheung C., Fang R.H., Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. - №108(27),Jul. – P. 10980-10985.
- 106 Hamidi M., Rafiei P., Azadi A., Mohammadi-Samani S. Encapsulation of valproate-loaded hydrogel nanoparticles in intact human erythrocytes: a novel nano-cell composite for drug delivery // J. Pharm Sci. – 2011. – №100(5). – P. 1702-1711.
- 107 Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2012. - №95. – P. 258-265.
- 108 Лохвицкий С.В., Гуляев А.Е., Кивман Г.Я., Жаугашева С.К., Нигматулин А.З. Лейкоцитарный транспорт антибиотиков и связанные с этим феноменом изменения фармакокинетики препаратов // Современное состояние и перспективы развития фармакокинетики: третья Всесоюз. конф. по фармакокинетике. - М., 1991. - С. 91-92.
- 109 Гуляев, А.Е., Ермекбаева Б.А., Кивман Г. Я., Радченко Т. Г., Шерстов А.Ю. Наночастицы как вектор направленного транспорта антибиотиков // Химико-фармацевтический журнал. - 1998. - №3. - С. 3-5.
- 110 Гуляев А.Е., Швечихин А.Ю. Связывание антибиотиков макрофагами: возможности модификации количественных показателей // Медицина и экология. - 2000. - №2. - С. 53-55.
- 111 Lokhvytsky S.V., Alberton I.N., Gulyayev A.E. The target transport of antibiotics upon their injection in the leucocytal containers // 3rd Jerusalem conf. On pharmaceutical science and clinical pharmacology. – 1996. - №1-6. - P. 41-50.
- 112 Кивман Г.Я., Гуляев А.Е. Клеточная фармакокинетика антибиотиков // Первый российский национальный конгресс "Человек и лекарство". - М., 1992. – С. 12-13.
- 113 Гуляев А.Е., Нигматулин А.З. Надирова Б.А. Кивман Г.Я. Зависимость количественных характеристик клеточной фармакокинетики от возраста: связывание антибиотиков лейкоцитами периферической крови человека // Фармакокинетика и фармакодинамика лекарственных веществ в эксперименте и клинике. - Алматы, 1992. - С. 92-95.
- 114 Жумадилов Ж. Ш., Макаренкова Р.В. Фармакокинетика канамицина при направленном транспорте в печень в теньях эритроцитов у животных с экспериментальным острым холециститом // Антибиотики и химиотерапия. – 1990. - №11. – С. 37-38.
- 115 Rechsteiner M.C. Uptake of Protein by Red Cells // Exp. Cell Res. – 1975. – №43. - P. 487-492.

- 116 Tajerzadeh H., Hamidi M. Evaluation of the hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in human intact erythrocytes // *Drug Devel. Ind. Pharm.* – 2000. – №26. – P. 1247–1257.
- 117 Westphal U. *Methods Enzymol* // Ed. Lovenstein J. M. - New York-London: AcadPress, 1969. - V.15. - P. 761-796.
- 118 Singh D.K., Maheshwari G. Chromatographic studies of some cephalosporins on thin layers of silica gel G-zinc ferrocyanide // *Biomed Chromatogr.* – 2010. - №24(10), Oct. – P. 1084-1088.
- 119 Eric-Jovanovic S., Agbaba D., Zivanov-Stakic D., Vladimirov S. PTLC determination of ceftriaxone, cefixime and cefotaxime in dosage forms // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. - №18(4-5). – P. 893-898.
- 120 Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. - М.: РАМН, 2003. - 208 с.
- 121 Белоусов Ю.Б., Гуревич К.Г. Общая и частная клиническая фармакокинетика. - М.: Ремедиум, 2006. - 807 с.
- 122 Заборовский А.В., Гуревич К.Г. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ // *Сибирский онкологический журнал.* – 2017. - №16(2). – С. 27-32.
- 123 Bisson R., Schiavo G., Montecucco C. ATP induces conformational changes in mitochondrial cytochrome c oxidase. Effect on the cytochrome c binding site // *J. Bio. Chem.* – 1987. - №262(13). – P. 5992-5998.
- 124 Taanman J.W., Turina P., Capaldi R.A. Regulation of cytochrome c oxidase by interaction of ATP at two binding sites, one on subunit Via // *Biochemistry.* – 1994. - №33(39). – P. 11833-11841.
- 125 Beauvoit B., Rigoulet M. Regulation of cytochrome c oxidase by adenylic nucleotides. Is oxidative phosphorylation feedback regulated by its end-products? // *IUBMB Life.* – 2001. - №(3-5). – P. 143-152.
- 126 Lipsky B.A., Dryden M., Gottrup F., Nathwani D., Seaton R.A., Stryja J. Antimicrobial stewardship in wound care: a Position Paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association // *J. Antimicrob Chemother.* – 2016. - №71(11). – P. 3026-3035.
- 127 Goff D.A., Kullar R., Bauer K.A., File T.M. Jr. Eight Habits of Highly Effective Antimicrobial Stewardship Programs to Meet the Joint Commission Standards for Hospitals Clin Infect Dis. – 2017. - №64(8). – P. 1134-1139.
- 128 Wu M.X., Wang X., Yang Y.W. Polymer Nanoassembly as Delivery Systems and Anti-Bacterial Toolbox: From PGMA to MSN@PGMA // *Chem. Rec.* – 2017. – № 4 // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28675576>.
- 129 Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. - №14(12). – P. 1227-1249.
- 130 Lee S., Kivimäe S., Dolor A., Szoka F.C. Macrophage-based cell therapies: The long and winding road // *J. Control Release.* – 2016. - №240. - P. 527-540.

- 131 Villa C.H., Anselmo A.C., Mitragotri S., Muzykantov V. Advanced drug delivery reviews. – 2016. - №106. – P. 88-103.
- 132 Zhao Y., Tang S., Guo J., Alahdal M., Cao S., Yang Z., Zhang F., Shen Y., Sun M., Mo R., Zong L., Jin L. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy Scientific Reports. – 2017. - №7. - P. 44758-44759.
- 133 Dong X., Chu D., Wang Z. Leukocyte-mediated Delivery of Nanotherapeutics in Inflammatory and Tumor Sites // *Theranostics*. – 2017. - №7(3). – P. 751-763.
- 134 Pang L., Zhang C., Qin J., Han L., Li R., Hong C., He H., Wang J. A novel strategy to achieve effective drug delivery: exploit cells as carrier combined with nanoparticles // *Drug Deliv.* – 2017. - №24(1). - P. 83-91.
- 135 Bax B.E., Bain M.D., Talbot P.J. et al. Survival of carrier erythrocytes in vivo // *Clin. Sci.* – 1999. - №96. – P. 171–178.
- 136 Briones E., Colino C.I., Millán C.G., Lanao J.M. Increasing the selectivity of amikacin in rat peritoneal macrophages using carrier erythrocytes // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2009. - №38(4). – P. 320-324.
- 137 English D., Cui Y., Siddiqui R., Patterson C., Natarajan V., Brindley D.N., Garcia J.G. Induction of endothelial monolayer permeability by phosphatidate // *J. Cell Biochem.* – 1999. - №75(1). – P. 105-117.
- 138 Carvalho A.S., Rodriguez M.S., Matthiesen R. Red Blood Cells in Clinical Proteomics // *Methods Mol. Biol.* – 2017. - №1619. – P. 173-181.
- 139 Scalise M., Galluccio M., Pochini L., Console L., Barile M., Giangregorio N., Tonazzi A., Indiveri C. Studying interactions of drugs with cell membrane nutrient transporters: new frontiers of proteoliposome nanotechnology // *Curr. Pharm Des.* – 2017. - №15 // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28625135>.
- 140 Geldenhuys W.J., Khayat M.T., Yun J., Nayeem M.A. Drug Delivery and Nanoformulations for the Cardiovascular System // *Res. Rev. Drug Deliv.* – 2017. - №1(1). - P. 32-40.
- 141 Attar A., Bakir C., Yuce-Dursun B., Demir S., Cakmakci E., Danis O., Birbir M., Ogan A. Preparation, characterization and in vitro evaluation of isoniazid and rifampicin-loaded archaeosomes // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2017. - №1 // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28667670>.
- 142 Rossmann C., McCrackin M.A., Armeson K.E., Haemmerich D. Temperature sensitive liposomes combined with thermal ablation: Effects of duration and timing of heating in mathematical models and in vivo// *PLoS One*. – 2017. - №12 (6) // <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179131>.
- 143 Lucas A.T., Herity L.B., Kornblum Z.A., Madden A.J., Gabizon A., Kabanov A.V., Ajamie R.T., Bender D.M., Kulanthaivel P., Sanchez-Felix M.V., Havel H.A., Zamboni W.C. Pharmacokinetic and screening studies of the interaction between mononuclear phagocyte system and nanoparticle formulations and colloid forming drugs // *Int. J. Pharm.* – 2017. - №526(1-2). – P. 443-454.
- 144 Fujiwara K. Distribution and accumulation of antibiotics in cells and tissues and toxicity studies by immunocytochemistry // *Yakugaku Zasshi*. – 2011. - №131(6). – P. 949-960.

145 Blasi F., Aliberti S., Tarsia P. Clinical applications of azithromycin microspheres in respiratory tract infections // Int. J. Nanomedicine. – 2007. - №2(4). – P. 551-559.

146 Wu J., Wang Y., Li L. Functional significance of exosomes applied in sepsis: A novel approach to therapy // Biochim. Biophys Acta. – 2017. - №1863(1),Jan. – P. 292-297.