

1. Государственная Фармакопея СССР X издания.— М., 1968.

2. Кувырченкова И. С. Сравнительное изучение физико-химических свойств и разработка методов оценки качества производных фенотиазина: Автореф. дисс. ...канд. фарм. наук.— М., 1982.

3. Кувырченкова И. С., Прокофьева В. И., Арзамасцев А. П., Сенов П. Л. Открытия.— 1982.— № 9. А. с. 911261 СССР.

Поступила 30.12.94.

USE OF HYDROXYLAMIN OF HYDROCHLORID AS AN OXIDIZER FOR THE QUALITATIVE AND QUNATITATIVE

УДК 615.033:543.42.063

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФАБЕНЗИДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Д. А. Валимухаметова, В. И. Погорельцев, С. Ю. Гармонов, Г. Г. Трубникова, Д. Б. Багаутдинова, Г. К. Будников, М. И. Евгеньев

Кафедра клинической фармакологии и внутренних болезней № 3 (зав.— проф. Д. А. Валимухаметова)
Казанского медицинского университета, кафедра аналитической химии (зав.— проф. В. С. Цивунин) Казанского технологического университета

Индивидуальные фармакокинетические особенности лекарственных средств в большинстве случаев обусловлены различиями в их всасывании, распределении, метаболизме и экскреции. В ряде случаев заключение о неэффективности препарата является следствием неадекватности схемы его дозирования, что обусловлено, в свою очередь, отсутствием метода количественного определения лекарственного препарата в биологических средах целостного организма.

Фосфабензид (гидразид дифенилфосфинилуксусной кислоты) является представителем класса гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот и был предложен как нейротропное средство для лечения алкоголизма, височной эпилепсии и гипоталамических расстройств различного генеза, как транквилизатор при некоторых психических заболеваниях и как средство премедикации в стоматологии [3, 7]. Препарат разрешен Фармакологическим комитетом МЗ СССР для клинического применения при лечении алкоголизма. Однако фармакокинетика фосфабензида (ФБ) не изучена, хотя такие исследования необходимы для оценки его эффективности и оптимизации использования в клинике. Описанные в литературе методы определения содержания фосфабензида

в лекарственных формах [6], основанные на получении окрашенных производных с п-диметиламинобензальдегидом и по собственному поглощению ФБ в области УФ-спектра, не селективны при анализе биологических жидкостей.

В задачи исследования входили разработка метода определения содержания фосфабензида в биологических жидкостях, а также изучение процесса связывания препарата биологическими субстратами.

Для большинства препаратов показана более тесная связь между фармакологическим эффектом и концентрацией, чем между эффектом и дозой [8]. Важное значение для изучения механизма действия фосфабензида имеет рассмотрение всех звеньев его терапевтического эффекта: доза→концентрация в плазме крови→концентрация в месте действия→взаимодействие с фармакорецептором→эффект на уровне ткани→наблюдаемый фармакологический эффект→терапевтический эффект.

Определение концентрации препарата в плазме крови и конечного эффекта позволяет установить активную концентрацию для обеспечения фармакологического и терапевтического эффектов.

Для определения содержания фосфабензида в крови и моче в качестве реагента использован 4-хлор-5,7-динитробензофуразан (БФЗ). Он является реакционноспособным и высококонтрастным реагентом для обнаружения соединений гидразина методом спектрофотометрии [1, 2]. Избирательное спектрофотометрическое выявление гидразидов кислот в виде

их динитробензофуразаповых производных при этом возможно в присутствии алкаламинов, алкилгидразинон, аминокислот, других органических веществ. Некоторые из них могут быть потенциальными метаболитами фосфабензида.

При взаимодействии ФБ с ацетонитрильным раствором БФЗ (20-кратный избыток) образуется продукт аналитической реакции, окрашенный в красный цвет. Линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации ФБ соблюдается в интервале 10^{-4} — $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, что составляет всю область фармакокинетических концентраций лекарственного вещества. Остаточное влияние эндогенных азотистых низкомолекулярных органических веществ, присутствующих в крови и моче, которые также образуют окрашенные продукты с БФЗ, незначительно. Подобное влияние можно устранить при использовании раствора сравнения — центрифугата анализируемого образца, в котором ФБ количественно разрушается перекисью водорода, что не приводит к искажению состава других компонентов матрицы. Метод апробирован на плазме, сыворотке, цельной крови (образцы предоставлены Республиканской станцией переливания крови) и моче. Результаты определений приведены в таблице.

В пробе биологической жидкости (кровь, моча) объемом 4 мл проводят осаждение белков после добавления 1 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Из пробы крови предварительно удаляют кровяной сгусток. После отделения белков двукратным центрифугированием (6000 об./мин) пробы нейтрализуют буферным раствором (рН 5,5; объем — 0,5 мл) и к ним добавляют 0,25 мл ацетонитрильного раствора БФЗ с концентрацией 0,02 моль/л. Через 5 минут анализируемые пробы фотометрируют при 500 нм относительно растворов сравнения. В качестве последних используют анализируемые биологические пробы (4 мл) с тем же содержанием БФЗ, в которых ФБ удален добавлением 0,1 мл 30% пергидроля. Эту операцию проводят в кислой среде до нейтрализации анализируемой пробы буферным раствором.

Фармакологический эффект в организме определяется как характером всасывания и экскреции, так и закономерностями инактивации. Специфическая активность препарата снижается вследствие необратимого химического разрушения либо обратимого связывания с различными биосубстратами, что может отождествляться с депонированием. Как известно, многие препараты связываются с белками сыворотки крови, в основном с альбумином [4].

Процесс связывания ФБ с белками плазмы крови исследовали *in vitro* методом равновесного диализа [5]. Инкубацию лекарственного вещества проводили при 25°C в течение суток. Снижение концентрации ФБ в диализном мешке контролировали постановкой реакции с БФЗ. Параллельно ставили контрольный опыт с дистиллированной водой. Степень связывания ФБ составила $30 \pm 3\%$.

Основные процессы фармакокинетики и фармакодинамики определяются свободной, а не связанной с белками частью препарата в крови, проходящего через различные гистогематические барьеры, фильтрующегося в почечных клубочках и проникающего к месту действия. Как показывают данные связыва-

ния, полученные нами в экспериментах *in vitro*, фосфабензид слабо связан с белками, и его суммарная концентрация в плазме близка к уровню свободного препарата. Однако точный расчет уровня свободного препарата может быть осложнен при таких патологически измененных условиях связывания, как понижение уровня альбумина в сыворотке, или при возможном вытеснении препарата билирубином из комплекса с белком в случае гипербилирубинемии.

Для многих лекарственных средств конечный терапевтический эффект зависит не столько от их концентрации в месте действия, сколько от экпозиции и, по всей видимости, связывание будет пролонгировать время пребывания препарата в крови и органах. Таким образом, связывание в известной степени предохраняет от разрушения лекарственные вещества с короткими сроками циркуляции в организме. Пролонгированный фармакологический эффект проявляется и в результате десорбции или диссоциации комплекса препарата с биосубстратом, так как часть свободного лекарства элиминирует в результате экскреции или метаболизма, чем поддерживается постоянное соотношение между свободным и связанным препаратом.

Белок + свободное лекарство \rightleftharpoons связанное лекарство

Важное значение в выяснении активности, эффекта пролонгирования и клеточной проницаемости играет связывание лекарственных веществ с форменными элементами крови, в первую очередь, с эритроцитами, которые составляют около 40% объема крови. Связывание ФБ эритроцитами устанавливали после инкубирования лекарственного вещества ($2 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в 50 мл эритроцитарной массы при 25°C в течение суток. Надосадочную жидкость анализировали на содержание ФБ спектрофотометрическим методом в виде динитробензофуразанового производного. Для учета возможных изменений концентрации ФБ за счет возможных химических реакций и гемолиза эритроцитов проводили контрольную инкубацию препарата в тех же условиях. Данные эксперимента показали, что $78 \pm 4\%$ ФБ оказалось связанным с эритромахой.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о важной роли связывания с биосубстратами в кинетике препарата — в установлении эффективной концентрации в крови, элиминации из крови, прохождении через плазматическую мембрану и гистогематические барьеры и достижении терапевтической концентрации. Разработанный метод определения концентрации фосфабензида в крови и моче позволяет уточнить концентрацию активного вещества в клинических экспериментах *in vivo*, изучать его метаболизм и экскрецию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евгеньев М. И., Евгеньева И. И., Николаева Н. Г. и др. // Хим.-фарм. журн.—1991.— № 10.— С. 80.
2. Евгеньев М. И. и др. А. с. 171812 (СССР). Б. И.—1992.— № 9.
3. Заиконникова И. В., Вальдман А. В., Козловская М. М. и др. // Фармакол. и токсикол.—1980.— № 4.— С. 6.

4. Луйк А. И., Лукьянчук В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов.— М., 1971.
5. Методы экспериментальной химиотерапии. /Под ред. Г. Н. Першина.— М., 1971.
6. Пинягина К. В., Литвиненко А. В., Тарасова Р. И. и др. // Фармация.— 1992.— № 1.— С. 31—35.

7. Рыбакова Л. С., Семенова Л. А. Научн. тр. Казанского мед. ин-та.— Казань, 1974.— Т. I.— Вып. 2.— С. 127—131.
8. Холодов Л. А., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика.— М., 1985.

Поступила 16.12.94.

УДК 616.831—001.32—07:616.832.9—008.8—076.5

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИКВОРА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ОЧАГОВ РАЗМОЗЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Х. М. Шульман, Р. И. Ягудин, Р. Ф. Тумакаев

Кафедра нервных болезней, нейрохирургии и медицинской генетики
(зав.— заслуж. деят. науки РТ, проф. М. Ф. Исмаилов)

Казанского медицинского университета,

Больница скорой медицинской помощи (главврач — Ю. А. Анисимов), г. Казань

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении больных с тяжелой черепно-мозговой травмой (ТЧМТ), летальность среди них остается весьма высокой (40—60%), особенно среди больных с травматическими очагами размозжения головного мозга (ОРГМ). Формирование очага размозжения головного мозга как объемного образования нередко завершается развитием дислокационного синдрома, требующего неотложного хирургического разрешения [3, 5].

В литературе имеются сообщения о диагностической ценности аппаратных методов исследования в определении ОРГМ — церебральной ангиографии, многоосевой экзоцефалоскопии, компьютерной и ЯМР-томографии. Однако два первых метода отличаются относительно невысокой разрешающей способностью, последние же не получили широкого распространения из-за высокой стоимости.

Целью работы являлся поиск простого и доступного метода диагностики ОРГМ, применимого в повседневной практике. Из литературы известно, что у больных с ОРГМ в течение первых двух суток после получения травмы в спинномозговой жидкости увеличивается содержание белка [2]. Данный феномен объясняется попаданием в субарахноидальное пространство продуктов распада мозговой ткани из зоны ОРГМ. Наряду с этим высокое содержание белка в ликворе больных с ТЧМТ может быть обусловлено массивным субарахноидальным кровоотечением. Следовательно, большое содержание белка в спинномозговой жидкости больных с ТЧМТ не может служить достаточным основанием для диагностики ОРГМ.

Одновременно с этим обосновано предположить, что в момент получения ТЧМТ в очаге размозжения наряду с повреждением мозговой ткани происходит разрушение стенок кровеносных сосудов и форменных элементов крови, в том числе и эритроцитов. В таком случае гемоглобин разрушенных эритроцитов должен поступить в спинномозговую жидкость и окрасить надосадочную (полученную после центрифугирования) часть ее в розовый цвет. При этом интенсивность окраски, по-видимому, должна зависеть от массивности ОРГМ. Окрашивание ликвора в поясничном отделе субарахноидального пространства можно ожидать спустя 2—4 часа после получения травмы.

Как показали наблюдения, у 20 больных контрольной группы с ушибами головного моз-

га, осложненными субарахноидальной геморрагией, в первые 6 часов после травмы надосадочный ликвор был прозрачным и бесцветным или имел желтоватый оттенок. Отчетливая ксантохромия появлялась в спинномозговой жидкости больных этой группы спустя 12—14 часов.

В первые 2—3 дня после субарахноидального кровоотечения основная масса эритроцитов (90%) выводится в неизменном виде из подоболочечного пространства. Незначительная их часть подвергается фагоцитированию клетками арахноидальной системы оболочек мозга. Освобожденный гемоглобин под влиянием ферментов цитоплазмы арахноидальных клеток превращается в билирубин, который окрашивает ликвор в желтый цвет [1].

Интенсивность розового окрашивания надосадочного ликвора была исследована у 26 больных в возрасте от 18 до 60 лет с ТЧМТ и очагами размозжения головного мозга. Поясничный прокол и взятие спинномозговой жидкости (при отсутствии противопоказаний) осуществляли в интервале 4—8 часов после получения травмы. Очаги размозжения головного мозга верифицировали во время аутопсии и в ходе хирургических вмешательств (16 больных). Интенсивность окрашивания надосадочного ликвора в розовый цвет измеряли в величинах оптической плотности, определяемых с помощью фотоэлектрокалориметра КФК-2МП.

В центрифужную пробирку набирают 3—4 мл спинномозговой жидкости и центрифугируют при 1500 об./мин в течение 10 минут. Клеточные элементы ликвора и крови переходят в осадок. Надосадочный ликвор помещают в кювету объемом 3 мл и определяют его оптическую плотность в зеленом световом спектре (540 нм).

Надосадочный ликвор 8 больных с полюсно-базальной локализацией очагов размозжения головного мозга оказался окрашенным в розовый цвет, его оптическая плотность была равна $0,024 \pm 0,003$ ед. ($P < 0,001$). Наиболее интенсивное окрашивание ликвора и высокие показатели оптической плотности ($0,033 - 0,038$) отмечены у 4 пациентов с ОРГМ, превышающими 3 см в диаметре. У 12 больных с конвексальными очагами размозжения, диаметр которых был более 3 см, оптическая плотность надосадочного ликвора составляла $0,016 \pm 0,002$ ед. ($P < 0,005$). У 6 пострадавших с диаметром очагов размозжения менее 3 см