



УДК 577.114.7.017

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
НОВОГО ПЛАЗМОЗАМЕНИТЕЛЯ НА ОСНОВЕ  
ОКСИЭТИЛИРОВАННОГО КРАХМАЛА**

**Гудряшов Л. И.**, Дюбровский В. А., Алексеева Г. С.,  
Яровая С. М., Членов М. А., Гринева Л. П.,  
Грюкова Г. Н., Телкова Т. Н., Смирнов А. В.,  
Маевский Е. И., Котова Ю. А.

*Всесоюзный научно-исследовательский институт технологии  
кровезаменителей и гормональных препаратов, Москва,*

Получены образцы оксиэтилированного крахмала со средневесовой молекулярной массой 100 000—160 000, среднечисленной молекулярной массой 50 000—60 000 и молярной степенью оксиэтилирования 0,6—0,7. Показано, что оксиэтилкрахмалы расщепляются амилолитическими ферментами. Все образцы оксиэтилкрахмала при концентрациях от 2 до 4% совместимы с перфторуглеродной эмульсией «Перфторан» и обладают в ее составе высокой гемодинамической эффективностью. 6 и 10% растворы оксиэтилкрахмала в 0,9% растворе NaCl также нормализуют гемодинамику при массивных кровопотерях и полностью выводятся из русла крови. Препараты токсикологически безвредны.

В настоящее время в качестве гемодинамического компонента кровезаменителя — переносчика кислорода на основе перфторуглеродной эмульсии применяют три плазмозаменителя — альбумин человека, декстран и оксиэтилкрахмал (ОЭК). Препараты на основе декстрана с молекулярными массами 40 000 и 70 000 вызывают разложение эмульсии уже при концентрации 1,5% [1—5]. Альбумин при массивных кровопотерях не обеспечивает в составе эмульсии необходимого онкотического давления. Кроме того, использование одного из компонентов донорской крови в составе синтетического кровозаменителя дорого и нецелесообразно [6].

Наиболее перспективным гемодинамическим компонентом является ОЭК. Он хорошо совместим с перфторуглеродной эмульсией и обеспечивает необходимое онкотическое давление в русле крови [1, 7].

Целью настоящей работы было получение образцов ОЭК с различными физико-химическими характеристиками, оценка их совместимости с эмульсией «Перфторан» и характеристика биологических свойств как в составе эмульсии, так и в качестве самостоятельного плазмозаменителя. Образцы ОЭК были получены алкилированием амилопектинового кукурузного крахмала, содержащего 98—99% амилопектина, окисью этилена в присутствии щелочного катализатора, последующей частичной деструкцией и фракционированием\*.

Анализ  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров полученных образцов ОЭК показал, что преимущественно (более 80%) оксиэтилируется  $\text{C}_{(2)}\text{-OH}$  глюкопиранозного остатка; доля алкилирования  $\text{C}_{(6)}\text{-OH}$  незначительна. В наиболее характеристической области спектра незамещенного амилопектинового крахмала, соответствующей сигналу  $\text{C}_{(1)}$ , регистрировали два сигнала при 101,6 и 100,5 м.д., отвечающих 4-О- и 4,6-ди-О-замещенным остаткам глюкозы (рис. 1а). В спектре изученных образцов ОЭК в этой области наблюдали уже три сигнала, которые отвечают 4-О-замещенным звеньям (101,6 м. д.), этим же звеньям, дополнительно замещенным оксиэтильными группами по  $\text{C}_{(2)}\text{-OH}$  (98,9 м.д. в результате  $\beta$ -эффекта) и по  $\text{C}_{(6)}\text{-OH}$

\* Способ получения образцов ОЭК будет опубликован отдельно.

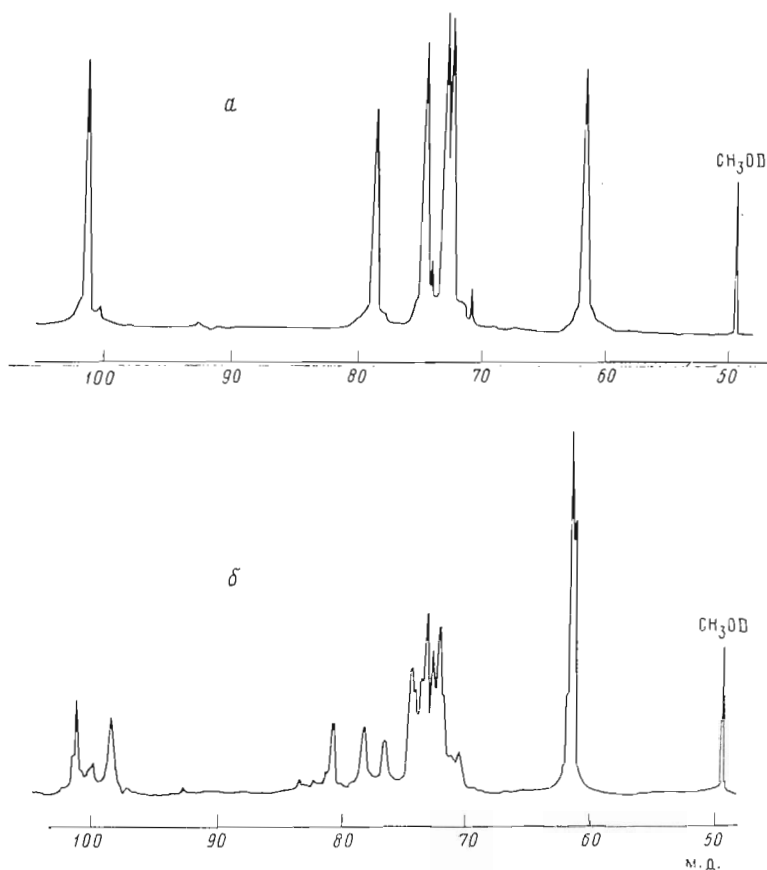


Рис. 1. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР амилопектинового крахмала (а) и оксидилированного крахмала (б) в  $\text{D}_2\text{O}$

(100,4 м.д.). Отсутствие расщепления в области сигнала  $\text{C}_{(4)}$  свидетельствует об отсутствии замещения по  $\text{C}_{(3)}$ -ОН-группе (рис. 1, б).

Физико-химические характеристики образцов ОЭК и его зарубежных аналогов — Плазмостерила (ФРГ) и 6-НЕС (Япония) — приведены в табл. 1. Как следует из табл. 1, степени замещения всех представленных образцов близки и составляют 0,6—0,7, что, по литературным данным, является оптимальным для гемодинамической эффективности препаратов [10]. Для оценки совместимости с эмульсией перфторуглеродов, гемодинамического действия, а также для оптимизации физико-химических характеристик препаратов на основе ОЭК были получены образцы ОЭК со средневесовой молекулярной массой ( $\bar{M}_w$ ) 100 000—160 000 [10], среднечисленной молекулярной массой ( $\bar{M}_n$ ) 50 000—60 000 и характеристической вязкостью ( $[\eta]$ ) 0,135—0,180.

Было показано, что ОЭК совместим с эмульсией «Перфторан». Существенных изменений оптических свойств эмульсии при концентрациях ОЭК 2—4% не происходило, что свидетельствовало о сохранении ее устойчивости. Добавление ОЭК в больших концентрациях приводило к образованию осадков. Для всех исследованных образцов ОЭК с  $[\eta]$  0,135—0,180 оптимальные сочетания величин оптического поглощения и относительной вязкости смесей с эмульсией получены при концентрации ОЭК 3% (табл. 2).

Известно, что ОЭК расщепляется в русле крови амилолитическими ферментами и что его гемодинамическая эффективность определяется скоростью выведения из сосудистого русла [9, 11—13]. Представлялось интересным выяснить влияние молекулярной массы и структуры оксидилированных крахмалов на скорость их ферментативного расщепления. С этой целью образцы ОЭК, Плазмостерил и 6-НЕС подвергали действию  $\alpha$ -амилазы из *Bacillus subtilis*. Как видно из табл. 1, степень ферментатив-

Физико-химические свойства оксигетилкрахмала

Образец	$[\eta]$ , дл/г	$\bar{M}_n$	Степень оксигетилирования	Степень гидролиза $\alpha$ -амилазой *	Коллоидно-осмотическое давление <sup>2*</sup> , мм H <sub>2</sub> O	$\eta$ <sup>2*</sup>
ОЭК 4/4	0,175	51 200	0,7	4,1	571	2,27
5/4	0,135	—	0,7	3,8	719	1,95
6/4	0,142	—	0,7	4,0	660	1,70
7/4	0,160	57 860	0,7	4,2	544	2,35
8/4	0,160	52 600	0,7	4,1	537	2,34
10/4	0,164	49 600	0,7	—	533	3,00
9/9	0,170	51 000	0,6	—	503	2,26
Плазмостерил 450/0,7 (ФРГ)	0,23–0,27 <sup>3*</sup>	—	0,7 <sup>3*</sup>	4,2	310	4,50 <sup>3*</sup>
6-НЕС	0,14–0,21 <sup>4*</sup>	60 000 <sup>4*</sup>	0,6–0,66 <sup>4*</sup>	7,0	447	—

\* Количество восстанавливающих сахаридов в пересчете на вес.% мальтозы.

<sup>2\*</sup> 6% раствор.<sup>3\*</sup> Лит. данные [8].<sup>4\*</sup> Лит. данные [9].

Таблица 2

Оценка совместимости гемодинамических компонентов (оксигетилкрахмала, декстрана, альбумина) с эмульсией «Перфторан»

Гемодинамический компонент	Содержание, % по весу	Характеристика смеси компонент — эмульсия		
		$A_{560}$	$\eta$	
ОЭК 4/4	2	0,180	2,8	
		0,190	2,9	
	3	0,200	3,0	
		0,210	3,1	
	4	0,270	3,4	
		0,170	2,8	
	7/4	2	0,190	3,1
		3	0,170	2,7
	8/4	2	0,190	2,9
		3	0,250	3,0
6-НЕС	2	0,310	3,2	
	3	0,480	3,7	
	4 *	0,320	2,4	
Альбумин	3	0,380	2,6	
	4	0,380	3,1	
Полиглюкин	1	0,400	3,6	
	1,5	0,140	2,4	
«Перфторан»	—			

\* Через 30 мин выпадает осадок.

ного гидролиза всех исследованных образцов ОЭК и Плазмостерила составляет 4–5%, тогда как амилопектиновый крахмал расщепляется на 85–90% (в расчете на мальтозу). Более высокую степень ферментативного гидролиза, по нашим данным, имел 6-НЕС (~7%), что, вероятно, объясняется большей долей 6-О-оксигетилирования его глюкозных остатков в сравнении с образцами ОЭК [9]. Образцы ОЭК и Плазмостерила, имеющие близкие степени замещения и  $\bar{M}_w$  от 100 000 до 450 000, не обнаружили существенных различий в устойчивости к  $\alpha$ -амилазе. Следовательно, молекулярная масса ОЭК практически не влияет на скорость ферментативного расщепления.

Большой интерес представляло исследование поведения препаратов ОЭК в русле крови, а именно их катаболизм и скорость выведения. В серии опытов 6% растворы ОЭК 5/4 и 6-НЕС в 0,9% NaCl вводили кроликам однократно, внутривенно, плеторически в дозе 20 мл/кг. Как видно из рис. 2, кривые изменения концентраций для ОЭК 5/4 и 6-НЕС почти совпадают; период полувыведения препаратов — примерно 24 ч. На 1, 3 и

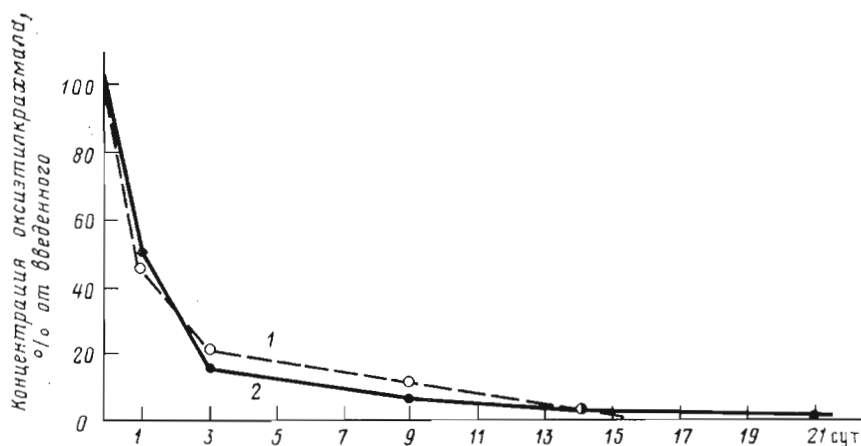


Рис. 2. Изменение концентрации 6-НЕС (1) и ОЭК 5/4 (2) в крови во времени после однократного введения

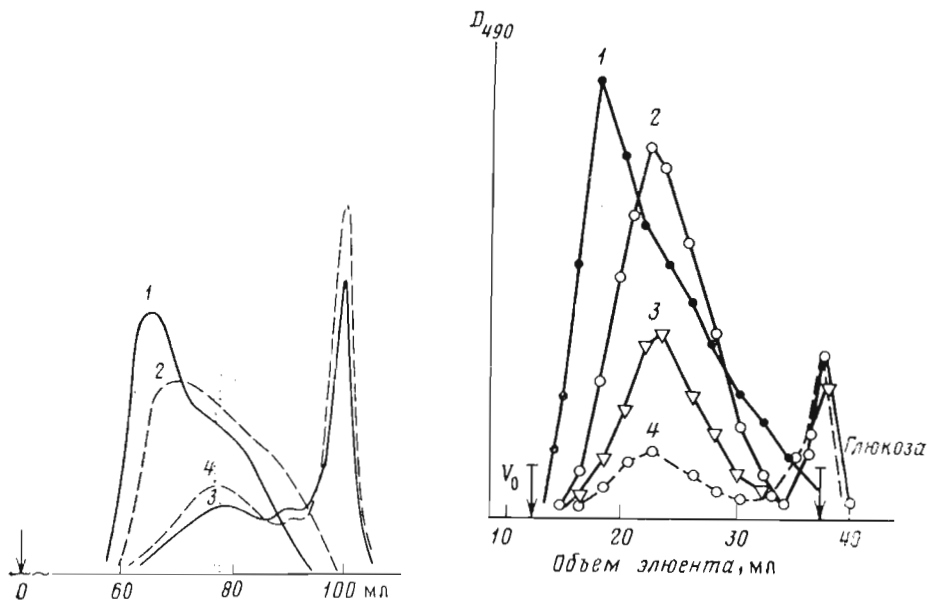


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Сравнительный анализ молекулярно-массового распределения ОЭК 5/4 (1, 3) и 6-НЕС (2, 4) с помощью ВЭЖХ (условия — см. «Экспер. часть»); образцы исходных полимеров (1, 2) и через 1 сут после введения в кровяное русло (3, 4)

Рис. 4. Анализ молекулярно-массового распределения ОЭК 5/4 исходного (1) и выведенного из кровяного русла через 1 (2), 3 (3) и 14 (4) сут после введения

14-е сут после введения препаратов значения концентраций составляют соответственно 50, 15 и 2% для ОЭК 5/4 и 45,5, 20 и 2% для 6-НЕС. ОЭК 5/4 обнаруживается еще и на 21-е сут в количестве 1% от исходного и полностью выводится из русла крови на 30-е сут.

На рис. 3 и 4 представлены хроматограммы образцов ОЭК 5/4 и 6-НЕС, исходных и выделенных из русла крови на 1—14-е сут. Видно, что исходные полимеры различаются по времени удерживания и профилям элюции. Через 1 сут после введения профили элюции полимеров смещены в сторону более низких молекулярных масс по сравнению с исходными образцами и почти совпадают. Полученные результаты указывают на значительное расщепление полимеров в крови в течение 1 сут и близкий катаболизм ОЭК 5/4 и 6-НЕС в русле крови. На 2—14-е сут положение максимума пика деградированного ОЭК 5/4 практически не меняется (рис. 4), однако во времени наблюдается дальнейшее сужение профиля

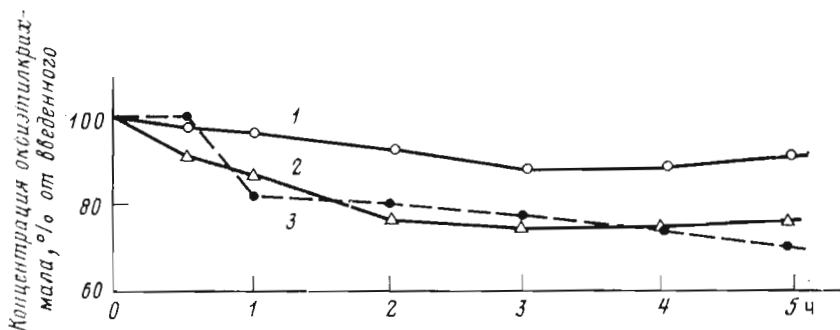


Рис. 5. Изменение концентрации ОЭЖ 7/4 в крови кроликов в течение первых часов после однократного введения 10% (1) и 6% раствора (2) ОЭЖ 7/4 в 0,9% NaCl и 6% полиглюкина (3)

элюции и уменьшение количества полимера в крови (кривые 2—4); через 30 сут обнаруживаются только низкомолекулярные продукты деградации ОЭЖ 5/4.

Полученные результаты позволяют заключить, что в течение первых суток происходит преимущественное расщепление высокомолекулярной фракции исходного полимера до молекулярных масс, обладающих наибольшей коллоидно-осмотической активностью (40 000—100 000) [8]. Фракции полимера, достигшие предела клубочковой фильтрации (70 000 для ОЭЖ [14]), выводятся из организма. В последующие несколько суток интенсивный процесс выведения полимера из русла крови сопровождается расщеплением его высокомолекулярной фракции. На 30-е сут ОЭЖ 5/4 полностью покидает сосудистое русло.

Данные по коллоидно-осмотическому давлению и вязкостные характеристики (табл. 1) свидетельствуют о способности изученных образцов ОЭЖ создавать высокое онкотическое давление при концентрациях 6—10%. Относительная вязкость растворов препаратов ОЭЖ в этом интервале концентраций близка вязкости крови.

Далее была изучена гемодинамическая эффективность ОЭЖ 4/4, ОЭЖ 5/4 при концентрации 3% в составе эмульсии «Перфторан» и ОЭЖ 7/4 (табл. 1) при концентрациях 6 и 10% в качестве самостоятельного плазмозаменителя. Препараты вводили обескровленным животным (собакам, кроликам) внутривенно в объеме кровопотери (30 мл/кг веса тела). В ходе экспериментов было установлено, что все исследованные образцы ОЭЖ со степенями замещения 0,6—0,7 и характеристическими вязкостями 0,135—0,180 нормализуют гемодинамику при кровопотерях ~70% как в составе эмульсии «Перфторан», так и сами по себе (раствор в 0,9% NaCl). Уже к моменту окончания введения препаратов животным происходило восстановление артериального давления до первоначального уровня, который поддерживался в течение 5 ч эксперимента. Изменение концентрации ОЭЖ в русле крови в ходе опыта по плазмозамещению представлено на рис. 5; видно, что оно незначительно.

При исследовании острой токсичности в опытах на кроликах и на крысах было установлено, что LD<sub>50</sub> для полученных образцов ОЭЖ составляет ~25 г/кг, в то время как эта величина для декстрана составляет 13,3 г/кг. Препараты ОЭЖ непиrogenны, не вызывают анафилактических реакций.

Таким образом, нами показано, что образцы оксиэтилкрахмала с  $\bar{M}_w$  100 000—160 000,  $\bar{M}_n$  50 000—60 000,  $[\eta]$  0,135—0,180, замещенные оксиэтильными группами в положении 2 глюкозных остатков (степень замещения 0,6—0,7), совместимы с перфторуглеводородной эмульсией «Перфторан». Препараты обладают высокой гемодинамической эффективностью при массивных кровопотерях (они в течение продолжительного времени поддерживают необходимое коллоидно-осмотическое давление), расщепляясь амилолитическими ферментами, полностью выводятся из русла крови и токсикологически безвредны.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР снимали в  $\text{D}_2\text{O}$  на приборе Bruker KR-80-DS (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 20,115 МГц (внешний эталон —  $\text{CH}_3\text{OD}$ ). Мольную степень замещения в образцах ОЭК определяли по методу Морганга [15].

Коллоидно-осмотическое давление и среднечисленную молекулярную массу образцов ОЭК определяли на осмометре Клауег (ФРГ) с использованием двухслойной мембраны.

Эмульсию «Перфторан» со средним размером частиц 0,1 мкм получали методом высокого давления [16]. Содержание перфторуглеродов 20%, содержание ионов фтора менее  $2 \cdot 10^{-5}$  М, осмотическое давление  $7,26 \cdot 10^4$  Па (320 мОсм/кг). При оценке совместимости ОЭК с эмульсией определяли поглощение при 560 нм и относительную вязкость при  $20^\circ\text{C}$  [17]. Измерение вязкости проводили на вискозиметре Оствальда.

Молекулярно-массовое распределение исследовали методом гель-проникающей хроматографии на колонке ( $28 \times 1,5$  см) с ультрагелем марки АсА-34, ММ 20 000—350 000 (Франция) (элюент — вода, анализ фракций фенол-серноокислотным методом [18]) и ВЭЖХ на хроматографе Du pont 830 (США) с детектором — дифференциальным рефрактометром Optilab (Швеция) (колонки SynChropak GPC 100 и GPC 500 фирмы SynChrom (США), размер  $25 \times 0,4$  см, подвижная фаза — 0,05% азид натрия).

Ферментативное расщепление ОЭК проводили  $\alpha$ -амилазой из *B. subtilis* (Serva, ФРГ). Степень ферментативного гидролиза определяли по восстанавливающей способности инкубационной смеси иодометрическим методом [19].

Концентрацию ОЭК в плазме определяли нефелометрически после отделения форменных элементов крови (центрифугированием 10 мин при 1800 об/мин) и осаждения белков добавлением к плазме равного объема 20% трихлоруксусной кислоты и последующим (через 10 мин) центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. К плазме добавляли 2,5-кратный объем этанола и через 15 мин измеряли поглощение на спектрофотометре Spocol (ГДР) при 540 нм. Концентрацию рассчитывали относительно количества полисахарида в плазме сразу после введения препарата; контроль — плазма без препарата.

При изучении гемодинамики растворы препаратов (эмульсию с ОЭК в составе и собственно ОЭК в 0,9% NaCl) вводили животным (кролики, собаки) однократно внутривенно и в объеме кровопотери (не менее 30 мл/кг веса тела) и плеторически в дозе 20 мл/кг.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mishler J. M., Ricketts C. R., Sutherland B. A., Bushord I. R. Brit. J. Clin. Pharmacol., 1979, v. 7, № 6, p. 619—622.
2. Matsumoto T., Watanabe M., Hamano T., Hanada S., Suyame T., Naito R. Chem. Pharm. Bull., 1977, v. 25, № 9, p. 2163—2171.
3. Geyer R. P. Fed. Proc., 1975, v. 36, № 6, p. 1499—1505.
4. Schmolks I. R. Fed. Proc., 1975, v. 34, № 6, p. 1449—1453.
5. Matsuki A., Wakayama S., Murakawa T., Yida T., Yamashita M., Oyama T. J. Anesthesiol., 1981, v. 31, № 1, p. 1—8.
6. Collins I. A., Larson A., Laxenaire M. C., Litwin M. S., Litz H., Ring I., Thoren L., Tschirren B. Vox sang, 1979, v. 36, p. 39—49.
7. Mitsuno T., Ohyanagi H., Naito R. Proceedings international symposium oxygen-carrying colloidal blood substitus (Mainz, 1981). Munich, W. Zuckzshwerdt, 1982, p. 30.
8. Рекламный проспект фирмы «Фрезениус» (ФРГ) на Плазмостерил-6% ОЭК (HAS 450/0,7), 1980.
9. Спецификация, тест-методы на ОЭК (HES, 6-HES) фирмы «Адживомото Ко» и «Моришита Фармацевтикал Ко», ЛТД, 1980.
10. Mishler J. M. In: Pharmacology of hydroxyethyl starch. N. Y., 1982, p. 14, 35.
11. Seyaku K., Kaisha K. Патент (Франция), 1973, № 2150272.
12. Huseman H. I., Resz R. J. Polym. Sci., 1956, v. 19, p. 389—400.
13. Mishler J. M., Rickett C. R., Parkhouse E. I. Brit. J. Clin. Pharmacol., 1979, v. 7, № 5, p. 505—509.
14. Mishler J. M. J. Surg. Res., 1977, v. 23, № 4, p. 239—245.
15. Lortz H. I. Anal. Chem., 1956, v. 28, № 5, p. 891.
16. Technical Information Ser., 1981, № 8, The Green Cross Corporation.

17. Маевский Е. И., Шубаев Н. В., Капцов В. В., Примак-Миролюбов В. Н. В сб.: Мед.-биол. аспекты применения эмульсий перфторуглеродов. Пущино, 1983.
18. Dubois M., Gills K. A., Hemilton J. K. Anal. Chem., 1966, v. 28, p. 350.
19. Miller G. L., Burton A. L. Anal. Chem., 1959, v. 31, № 11, p. 1790—1793.

Поступила в редакцию  
24.X.1985.

## PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF A NEW PLASMA SUBSTITUTE ON THE BASIS OF HYDROXYETHYLSTARCH

[KUDRYASHOV L. I.], DOMEROVSKY V. A., ALEXEEVA G. S.,  
YAROVAYA S. M., CHLENOV M. A., GRIHEVA L. P., KRYUKOVA G. N.,  
TELKOVA T. N., SMIRNOV A. V., MAEVSKY E. I., KOTOVA Yu. A.

*All-Union Research Institute for Technology of Blood Substitutes  
and Hormone Preparations, Moscow*

Samples of hydroxyethylstarch of  $M$  100—160 kDa,  $M_n$  50—60 kDa and substitution degree 0,6—0,7 were prepared and characterized. Hydroxyethylstarch was shown to be susceptible to cleavage by amylolytic enzymes. All samples of hydroxyethylstarch at 2—4% concentration were compatible with perfluorohydrocarbon emulsion «Perftoran» and exhibited high haemodynamic efficiency. The 6 and 10% solutions of hydroxyethylstarch in 0,9% aqueous sodium chloride normalized haemodynamics in massive blood losses. Hydroxyethylstarch was completely removed from blood-stream. The preparations were shown to be nontoxic.