

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ. ЧАСТЬ III: ТАРГЕТНАЯ ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

(аналитический обзор)

Баринов В.А.,¹ Бонитенко Е.Ю.,^{1,2} Гладчук А.С.,¹ Белякова Н.А.¹

¹ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова

Федерального медико-биологического агентства»,

192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

[E-mail: vladbar.57@yandex.ru](mailto:vladbar.57@yandex.ru)

²ФГБУН «Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика

Н.Ф. Измерова»

105275, Москва, пр. Буденного, д.31

РЕЗЮМЕ

Введение. При лечении тяжелой бронхолегочной патологии системное введение лекарственных средств (ЛС) зачастую сопряжено с многочисленными сложностями, связанными с их деградацией под действием сывороточных и печеночных ферментов и быстрого почечного клиренса, а также нарушений легочного кровотока ограничивающего пассивную диффузию препарата из крови в паренхиму легкого. Указанные сложности могут быть преодолены за счет использования местного введения ЛС путем ингаляции или инстилляции в дыхательные пути. Существует мнение, что внутрилегочное введение ЛС может позволить достичь более высоких концентраций в пораженных отделах по сравнению с другими путями введения. В то же время, адресная доставка снижает системное поглощение, что защищает нецелевые органы от побочного действия ЛС и позволяет доставить максимальную дозу препарата по назначению. В связи с этим, критически важным является подбор оптимального носителя для ЛС, который бы обеспечивал однородное распределение препарата по всей поверхности дыхательных путей. С этих позиций перспективными с точки зрения использования в качестве носителей для таргетной доставки ЛС в легкие представляются перфторуглеродные (ПФУ) жидкости, ввиду ряда их уникальных физико-химических свойств. Однако, несмотря на то, что перфторуглероды являются перспективными средствами для введения ЛС непосредственно в легкие, плохая растворимость большей части из них в ПФУ жидкостях представляет собой основное

препятствие для их использования в качестве средства доставки. Таким образом, поиск способов диспергирования или солюбилизации молекул лекарств в перфторуглеродах является одной из основных задач, которые требуется решить для использования последних в качестве средства доставки ЛС в легкие.

Цель исследования – определить перспективные подходы к созданию эмульсий и суспензий лекарственных средств в ПФУ жидкостях, которые могут быть использованы для адресной доставки непосредственно в пораженные участки легкой ткани для увеличения их терапевтической эффективности.

Материалы и методы. В качестве материалов были использованы российские и зарубежные научные публикации, выявленные в результате поиска в научных электронных библиотеках. Основным методом исследований было обобщение имеющихся литературных данных, посвященных способам использования ПФУ жидкостей в качестве носителей при эндотрахеальном введении лекарственных средств.

Результаты. В литературе представлены три основных подхода, которые могут быть использованы для адресной доставки ЛС в легкие с использованием перфторуглеродов. Первым и наиболее простым является растворение ЛС в ПФУ жидкостях и введение полученного раствора в легкие. Такой способ может применяться при работе с рядом фторсодержащих ЛС, которые хорошо растворимы в перфторуглеродах, в отличие от большинства других препаратов. Второй подход связан с созданием суспензий, в том числе твердых фармацевтических субстанций не растворимых в перфторуглеродах. Было показано, что такие суспензии обладают достаточно высокой стабильностью и хорошей терапевтической эффективностью. С целью повышения стабильности суспензий разработаны микронизированные формы и полые пористые микрочастицы, содержащие ЛС, которые обладают сродством к перфторуглероду. Последние показали свою высокую эффективность на различных моделях экспериментальной патологии у как у взрослых, так и у новорожденных лабораторных животных. Наряду с технологией получения полых пористых микрочастиц ЛС, солюбилизирующие агенты также могут быть использованы для увеличения растворимости твердых форм в перфторуглеродах. Третий подход состоит в создании обратных эмульсий типа «вода–в–ПФУ жидкости», которые позволяют добиться более равномерного и воспроизводимого распределения ЛС по сравнению с суспензиями. Следует также

отметить, что создание эмульсий «вода–в–ПФУ жидкости» является существенно менее дорогостоящим и трудозатратным процессом. Однако, подобные эмульсии, не смотря на их однородное распределение в тканях легких, обладают низкой стабильностью, что существенно затрудняет контроль дозы введенного препарата. Для стабилизации водных капель с целью создания субмикронных эмульсий типа «вода–в–ПФУ жидкости» с узким диапазоном распределения частиц прибегают к использованию эмульгаторов, и в первую очередь сурфактантов. Эффективность подобного подхода была продемонстрирована на лекарственных препаратах различных фармакологических групп таких как антибиотики, вазоактивные бронхолитики, муколитики, глюкокортикоиды, а также противотуберкулезные, холинергические и противоопухолевые средства.

Заключение. Вопрос об использовании ПФУ жидкостей для адресной доставки ЛС остается не только открытым, но и наполняется новым содержанием. Это связано с тем, что основным методом введения ЛС непосредственного в пораженные участки стала инстилляционная их в легкие во время (для новорожденных и недоношенных детей) или после (для детей старшего возраста и взрослых) бронхоальвеолярного лаважа. Указанный подход позволяет не только адресно ввести лекарственные препараты, но и создать оптимальные условия для реализации их фармакологического действия. Также можно сформулировать предварительные требования к эмульсиям ЛС в ПФУ в зависимости от фармакологической группы используемых лекарственных средств. При этом основным показателем является стабильность эмульсии ЛС в ПФУ, в соответствии с которой их можно разделить две основные группы: нестабильные и стабильные. Основной задачей нестабильных эмульсий является обеспечение введения ЛС непосредственно в целевую (пораженную) зону легкого до момента их деэмульгирования. При этом основным требованием к нестабильным эмульсиям ЛС является простота их приготовления и соответственно использования. В свою очередь применение стабильных эмульсий ЛС обосновано в том случае, если необходима не только адресная доставка препарата в пораженные участки легких, но и длительное поддержание в них высоких концентраций действующего вещества. Проведенный анализ литературы свидетельствует о том, что в настоящее время разработаны все необходимые подходы для создания как нестабильных, так и стабильных эмульсий ЛС с различными физико-химическими свойствами из различных фармакологических

групп в ПФУ жидкостях для их адресной доставки в целевые зоны легких во время или после лечебного бронхоальвеолярного лаважа.

Ключевые слова: адресная доставка, перфторуглероды, перфтордекалин, перфлуброн, лекарственные средства, эндотрахеальное введение, суспензии, эмульсии, жидкостная вентиляция легких, частичная жидкостная вентиляция легких.

**THE USE OF PERFLUOROCARBONS IN THE TREATMENT OF SEVERE
BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY. PART III: TARGETED DELIVERY OF
MEDICINES
(analytical review)**

Barinov V.A.,¹ Bonitenko E.U.,^{1,2} Gladchuk A.S.,¹ Belyakova N.A.¹

*¹Federal State Budgetary Institution «Scientific and Clinical Center of Toxicology named
after academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency*

192019, Sankt-Peterburg, str. Behtereva, 1

[E-mail: vladbar.57@yandex.ru](mailto:vladbar.57@yandex.ru)

*²Federal State Budgetary Science Institution «Scientific institute of occupational medicine
named after academician N.F. Izmerova»*

105275, Moskva, pr. Budennogo, 31

ABSTRACT

Introduction. In the treatment of severe bronchopulmonary pathology, systemic administration of drugs is often associated with numerous difficulties associated with their degradation under the action of serum and hepatic enzymes and rapid renal clearance, as well as pulmonary blood flow disorders limiting passive diffusion of the drug from the blood into the lung parenchyma. These difficulties can be overcome by the use of local administration of drugs by inhalation or instillation into the respiratory way. It is believed that intrapulmonary administration of drugs may allow achieving higher concentrations in the affected areas compared to other routes of administration. At the same time, targeted delivery reduces systemic absorption, which protects non-target organs from drug side effects and allows the maximum dose of the drug to be delivered as intended. In this regard, it is critically important to select the optimal carrier for the drug, which would meet homogeneous

distribution of the drug over the entire surface of the respiratory tract. From this point of view, the use of perfluorocarbon (PFC) liquids, due to a number of their unique physical and chemical properties, as carriers for targeted delivery of drugs to the lungs is promising. However, despite the fact that perfluorocarbons are promising agents for the administration of drugs directly into the lungs, the poor solubility of most of them in PFC liquids is a major obstacle to their use as a means of delivery. Thus, finding ways to disperse or solubilize drug molecules in perfluorocarbons is one of the main challenges that need to be solved in order to use the latter as a means of drug delivery to the lungs.

The aim of the study is to identify promising approaches to the creation of drug emulsions and suspension in PFC liquids, which can be used for targeted delivery directly to the affected areas of light tissue to increase their therapeutic efficacy.

Materials and methods. Russian and foreign scientific publications identified as a result of a search in scientific electronic libraries were used as materials. The main method of research was the generalization of available literature data on the methods of using PFC liquids as carriers for endotracheal administration of drugs.

Outcomes. There are three main approaches in the literature that can be used for targeted delivery of drugs to the lungs using perfluorocarbons. The first and simplest is to dissolve the drug in PFC liquids and inject the resulting solution into the lungs. This method can be used when working with a number of fluorinated drugs, which are highly soluble in perfluorocarbons, unlike most other drugs. The second approach is related to the creation of suspensions, including solid pharmaceutical substances that are insoluble in perfluorocarbons. Such suspensions have been shown to have sufficiently high stability and good therapeutic efficacy. In order to increase the stability of suspensions, micronized forms and hollow porous microparticles containing drugs were developed, which have an affinity for perfluorocarbons. The latter have shown their high efficiency in various models of experimental pathology in both adult and newborn laboratory animals. Along with the technology for the production of hollow porous microparticles of drugs, solubilizing agents can also be used to increase the solubility of solid forms in perfluorocarbons. A third approach is to create inverse emulsions of the water-in-PFC liquid type, which allow for a more uniform and reproducible distribution of drugs compared to suspensions. It should also be noted that the creation of water-to-PFC liquid emulsions is a significantly less expensive and labor-intensive process. However, such emulsions, despite their homogeneous distribution in the lung tissues, have low stability,

which significantly complicates the control of the dose of the injected drug. Emulsifiers, primarily surfactants, are used to stabilize aqueous droplets in order to create submicron emulsions of the water-in-PFC liquid type with a narrow range of particle distribution. The efficacy of this approach has been demonstrated on drugs of various pharmacological groups, such as antibiotics, vasoactive bronchodilators, mucolytics, glucocorticoids, as well as antituberculous, cholinergic and antitumor drugs.

Conclusion. The question of the use of PFC liquids for targeted drug delivery remains not only open, but is also filled with new content. This is due to the fact that the main method of injecting drugs directly into the affected areas was their instillation into the lungs during (for newborns and premature infants) or after (for older children and adults) bronchoalveolar lavage. This approach allows not only targeted administration of drugs, but also to create optimal conditions for the implementation of their pharmacological action. It is also possible to formulate preliminary requirements for drug emulsions in PFCs depending on the pharmacological group of drugs used. At the same time, the main indicator is the stability of the drug emulsion in PFCs, according to which they can be divided into two main groups: unstable and stable. The main task of unstable emulsions is to ensure the injection of drugs directly into the target (affected) area of the lung until they are demulsified. At the same time, the main requirement for unstable drug emulsions is the simplicity of their preparation and, accordingly, their use. In turn, the use of stable drug emulsions is justified if it is necessary not only to deliver the drug to the affected areas of the lungs, but also to maintain high concentrations of the active ingredient in them for a long time. The analysis of the literature indicates that at present all the necessary approaches have been developed for the creation of both unstable and stable emulsions of drugs with different physicochemical properties from various pharmacological groups in PFC liquids for their targeted delivery to the target areas of the lungs during or after therapeutic bronchoalveolar lavage.

Key words: targeted delivery, perfluorocarbons, perfluorodecalin, perflubron, drugs, endotracheal administration, suspensions, emulsions, liquid ventilation, partial liquid ventilation

ВВЕДЕНИЕ

При лечении тяжелой бронхолегочной патологии системное введение ЛС зачастую сопряжено с многочисленными сложностями, связанными с их потенциальной деградацией под действием сывороточных и печеночных ферментов и быстрого почечного клиренса. Нарушенный легочный кровоток в поврежденном легком в свою очередь может еще больше ограничивать пассивную диффузию препарата из крови в паренхиму легкого. Кроме того, степень удерживания лекарственных средств (ЛС) в тканях легких часто не достигает уровня, достаточного для проявления оптимального терапевтического эффекта. Указанные сложности могут быть преодолены за счет использования местного введения лекарственных препаратов путем ингаляции или инстилляции в дыхательные пути [1, 2]. Однако при многих острых и хронических заболеваниях легких происходит поражение дистально расположенных отделов, что определяет необходимость доставки биологических активных веществ именно в глубокие отделы легких для достижения оптимального терапевтического эффекта. В свою очередь, доставка ЛС в такие отделы легких требует получения частиц подходящего размера, что является сложной задачей. Кроме того, нарушения вентиляции в пораженных участках легких также снижают количество лекарства, достигшего целевых областей.

Существует мнение, что внутрилегочное введение ЛС может позволить достичь более высоких концентраций в пораженных отделах по сравнению с другими путями введения. В то же время, адресная доставка снижает системное поглощение, что защищает нецелевые органы от побочного действия ЛС и позволяет доставить максимальную дозу препарата по назначению. В связи с этим, критически важным является подбор оптимального носителя для ЛС, который бы удовлетворял необходимым требованиям относительно газотранспортных характеристик и обеспечивал однородное распределение препарата по всей поверхности дыхательных путей.

Перспективными с точки зрения использования в качестве носителей для таргетной доставки ЛС в легкие представляются перфторуглеродные (ПФУ) жидкости, ввиду ряда их уникальных физико-химических свойств [3]. Вследствие наличия в молекулах большого числа C–F связей, которые являются самыми сильными ковалентными связями в природе, перфторуглероды характеризуются высокой

устойчивостью к воздействию химических или биологических факторов среды. Перфторуглероды способны растворять кислород и диоксид углерода в значительно больших объемах, чем вода, что дает возможность использовать их в качестве дыхательных жидкостей при проведении различных видов жидкостной искусственной вентиляции легких (ЖИВЛ) [4, 5]. В тоже время, ПФУ жидкости обладают низким поверхностным натяжением, что позволяет им при попадании в легкие проникать в самые узкие дыхательные пути. Кроме того, перфторуглероды отличаются слабыми межмолекулярными взаимодействиями и высокой летучестью, поэтому они легко могут быть удалены из дыхательных путей испарением. Совокупность указанных выше свойств делает ПФУ жидкости привлекательными в качестве транспортных средств для внутрилегочного введения ЛС [6, 7].

Несмотря на то, что перфторуглероды являются перспективными средствами для введения ЛС непосредственно в легкие, плохая растворимость большей части из них в ПФУ жидкостях представляет собой основное препятствие для их использования в качестве средства доставки. Ввиду липо- и гидрофобных свойств простое смешивание ПФУ жидкостей и водного раствора или твердой формы большинства ЛС будет приводить к быстрому расслоению двухфазной системы. Таким образом, поиск способов диспергирования или солюбилизации молекул лекарств в перфторуглеродах является одной из основных задач, которые требуется решить для использования последних в качестве средства доставки лекарств в легкие.

Цель исследования – определить перспективные подходы к созданию эмульсий и суспензий лекарственных средств в ПФУ жидкостях которые могут быть использованы для адресной доставки непосредственно в пораженные участки легкой ткани для увеличения их терапевтической эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе проведен анализ зарубежных и отечественных публикаций, посвященных способам использования жидких перфторуглеродов в качестве носителей при эндотрахеальном введении ЛС, за последние 30 лет. В качестве материалов были использованы российские и зарубежные научные публикации, выявленные в результате поиска в научных библиотеках PubMed, EMBASE, SCOPUS и Elibriary, на основании следующих поисковых запросов: «перфторуглерод» (perfluorocarbon), «перфтордекалин» (perfluorodecalin), «перфлуброн» (perflubron),

«лекарственные средства» (medicines), «жидкостная вентиляция» (liquid ventilation), «эндотрахеальное введение» (endotracheal injection).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Растворимые в ПФУ жидкостях лекарства и пролекарства. Наиболее прямолинейный подход к использованию перфторуглеродов в качестве носителя для доставки заключается в растворении ЛС в ПФУ жидкостях и введении полученного раствора в легкие. Такой способ может применяться при работе с рядом фторсодержащих ЛС, которые хорошо растворимы в перфторуглеродах. Так, например, галотан, широко распространенное средство для ингаляционной анестезии, растворим в перфтордекалине (ПФД) [8] и может оказывать анальгезирующее действие при его введении в легкие с использованием ПФУ жидкости RIMAR-101 (Miteni, Италия) в качестве носителя в ходе ЖИВЛ, как было показано в экспериментах на взрослых самках хомяков [9].

В свою очередь, перфтороктилбромид (ПФОБ, перфлуброн) является нетипичным представителем ПФУ жидкостей и смешивается с рядом органических соединений [10]. На примере ПФОБ было продемонстрировано, что для улучшения растворимости в перфторуглеродах может быть применен подход с синтезом пролекарства, при котором исходная молекула ЛС химически модифицируется флуорофильным остатком, повышающим растворимость в перфтороктилбромиде. Предполагается, что при попадании пролекарства в ткани легких такой остаток будет отщепляться в результате химических превращений. Так, Hsu С.-Н. и соавт. [11] было показано, что ряд никотинатов являются перспективными пролекарствами никотиновой кислоты (предшественника никотинамидадениндинуклеотида – НАД), продемонстрировавшими свою эффективность в купировании последствий поражения легких, индуцированных блеомицином [12] и циклофосфамидом [13]. Фторалкилсодержащие эфиры никотиновой кислоты обладали существенно большей растворимостью в ПФОБ, чем никотиновая кислота, и при этом демонстрировали высокую скорость высвобождения исходного лекарства под действием эстераз. В опытах *in vitro* было выявлено, что фторсодержащие пролекарства никотиновой кислоты, растворенные в ПФОБ, могут переходить из ПФУ жидкостей в клетки, и в дальнейшем подвергаться ферментативному гидролизу с высвобождением исходного ЛС и конвертацией его в НАД [14].

Суспензии твердых фармацевтических субстанций в перфторуглеродах.

Другим способом доставки лекарств в легкие с помощью перфторуглеродов является формирование суспензий твердых фармацевтических субстанций в ПФУ жидкостях. Так, Wolfson M.R. и соавт. продемонстрировали, что жидкие перфторуглероды могут выступать в качестве эффективного средства доставки ряда вазоактивных препаратов в легкие [15, 16]. В этих исследованиях вазоактивные препараты, нерастворимые в перфторуглеродах (ацетилхолин, адреналин и присколин), диспергировали в ПФД (APF 140) и вводили через эндотрахеальную трубку недоношенным и новорожденным ягнятам в процессе ЖИВЛ. Животные контрольных групп, также подвергавшиеся ЖИВЛ, получали препараты внутривенно. Несмотря на нерастворимость в ПФД, ацетилхолин и адреналин вызывали дозозависимые специфические реакции после внутривенного или внутрилегочного введения. Так, после внутривенного введения препаратов изменения среднего артериального давления происходили раньше и были более выраженными, в то время как при внутрилегочном они были менее выраженными, но более длительными. В свою очередь присколин вызывал более ранний и выраженный системный ответ (т.е. снижение среднего артериального давления) при внутривенном введении, в то время как при внутрилегочном оказывал большее влияние на легочные реакции по сравнению с системными.

Brunelli L. и соавт. [17] в экспериментах на новорожденных новозеландских белых кроликах исследовали внутрилегочное введение рекомбинантной CuZn супероксиддисмутазы человека (rhSOD) в качестве средства антиоксидантной защиты у недоношенных новорожденных с острым повреждением легких, индуцированным лаважом физ. раствором (10 мл/кг). В ходе работы авторы использовали суспензию нанопорошка rhSOD в смеси перфторметилциклогексан : перфторметилдекалин (в соотношении 25 : 75). Суспензию готовили смешиванием rhSOD (5 мг/кг) со смесью перфторуглеродов (18 мл/кг) с последующей ультразвуковой обработкой в течение 5–10 мин. Эндотрахеальное введение суспензии нанокристаллов в смеси перфторуглеродов приводило к улучшению доставки rhSOD и более гомогенному распределению фермента в тканях легких по сравнению эндотрахеальным введением rhSOD в физ. растворе. Кроме того, в тех частях легких, для которых отмечались самые высокие уровни содержания rhSOD, наблюдалось уменьшение окислительного повреждения легких.

Wolfson M.R. и соавт. [18] в экспериментах на половозрелых самках мериносов была проверена гипотеза о том, что использование ПФУ жидкостей может положительным образом влиять на распределение активатора плазминогена (АП) в легких для лечения тромбоза дыхательных путей в случае образования фибриновых слепков при остром поражении легких, индуцированном вдыханием дыма. На первом этапе исследователи выявили, что исследуемые АП (тканевый и одноцепочечный урокиназный) стабильны и не теряют своей ферментативной активности после диспергирования и хранения в составе суспензии в ПФОБ (FluoroMed L.P., США) как минимум в течение 48 часов. Через 4 часа после индуцирования поражения легких вдыханием дыма от горящего хлопка, эндотрахеально вводилась первая доза суспензии АП в ПФОБ (4 или 8 мг в 8 мл ПФОБ), после чего введение повторялось еще 6 раз через каждые 8 часов. В контрольной группе вместо суспензии вводили чистый перфтороктилбромид в аналогичной дозе. Было установлено, что введение только ПФОБ не влияло на морфометрические индексы гистологических изменений в дыхательных путях или паренхиме легких. Напротив, доставка АП с помощью ПФОБ привела к значительно лучшим результатам с точки зрения физиологических и гистологических параметров. При этом использование одноцепочечного урокиназного АП в наибольшей дозе (8 мг) сопровождалась наилучшими результатами с точки зрения оцениваемых параметров (гемодинамики, гистоморфологии легких, биохимических показателей жидкости после бронхоальвеолярного лаважа). Кроме того, по сравнению с небулизацией АП, где только малая доля эмитированного с небулайзера вещества доставлялась в легкие, использование ПФОБ в качестве носителя позволяло осуществлять эффективную доставку всей дозы АП в легкие.

С целью повышения стабильности суспензий ЛС в ПФУ жидкости предпринимались попытки создания микронизированных форм лекарственных препаратов, которые обладали бы сродством к перфторуглероду. Примером такой технологии является PulmoSpheres™, которая позволяет получать полые пористые микрочастицы лекарств диаметром 3–5 мкм методом распылительной сушки [19, 20]. Так, Smith D.J. и соавт. в работе [21] исследовали фармакокинетику и тканевое распределение гентамицина после его эндотрахеального введения в виде суспензии микрочастиц PulmoSpheres™ в перфторуглероде в легкие интактных новозеландских белых кроликов. Было установлено, что при эндотрахеальном введении суспензии

гентамицина в ПФОБ (Alliance Pharmaceutical Corp., США) его концентрация в тканях легких была на два порядка выше, чем при внутримышечном и внутривенном введениях в эквивалентной дозе, и оставалась высокой в течении последующей недели (общая доза гентамицина во всех группах – 5 мг/кг). При этом концентрация гентамицина в сыворотке крови была значительно ниже предела нефротоксичности на протяжении всего периода наблюдения.

В работе Dickson E.W. и соавт. [22] провели сравнение пяти различных схем лечения пневмококковой (*Streptococcus pneumoniae*) пневмонии у самцов крыс линии Вистар с использованием ампициллина: 1) однократное внутримышечное введение ампициллина (25 мг/кг); 2) модифицированная жидкостная вентиляция легких (ЖВЛ) с использованием ПФОБ (Alliance Pharmaceutical Corp., США) в дозе 25 мл/кг; 3) эндотрахеальное введение ампициллина (25 мг/кг в 1 мл физ. раствора) с последующей модифицированной ЖВЛ с использованием ПФОБ в дозе 25 мл/кг; 4) внутримышечное введение ампициллина (25 мг/кг) с модифицированной ЖВЛ с использованием ПФОБ в дозе 25 мл/кг; 5) модифицированная ЖВЛ с использованием ПФОБ (25 мл/кг), содержащего PulmoSpheres™ с ампициллином (25 мг/кг). В отличие от обычной частичной жидкостной вентиляции легких (ЧЖВЛ), где требуется использование искусственной вентиляции легких (ИВЛ) на всем протяжении инкубации с ПФУ жидкостью, в модифицированной ЖВЛ животные были отключены от ИВЛ, что позволяло им спонтанно дышать, в то время как жидкость оставалась в легких. Исследование показало, что выживаемость в группах, которые подвергались модифицированной ЖВЛ в комбинации с введением ампициллина любым из описанных трех способов, была выше, чем в группах с только модифицированной ЖВЛ или внутримышечным введением. При этом наибольший процент выживших особей наблюдался в группе, получавшей суспензию PulmoSpheres™ ампициллина в ПФОБ с помощью модифицированной ЖВЛ.

Также Dickson E.W. и соавт. [23] была проверена гипотеза о том, что профилактическое использование полых пористых микрочастиц (MediSpheres; Alliance Pharmaceutical Corp, США), содержащих антибиотик (тобрамицин), в виде суспензии в перфторуглероде может приводить к увеличению выживаемости в модели вентилятор-ассоциированной пневмонии. Эксперимент проводили на самцах крыс линии Вистар на модели пневмонии, индуцированной *Klebsiella pneumoniae*. За 24 часа до

бактериальной инокуляции животные получали один из видов профилактического воздействия: 1) тобрамицин внутримышечно (1 мг/кг); 2) ЧЖВЛ с ПФОБ (LiquiVent[®], Alliance Pharmaceutical Corp, США) и пустыми MediSpheres (2,5 мл/кг); 3) ЧЖВЛ с пустыми MediSpheres (2,5 мл/кг) и внутримышечное введение тобрамицина (1 мг/кг); 4) ЧЖВЛ с MediSpheres (2,5 мл/кг), содержащими тобрамицин (1 мг/кг). К концу эксперимента только в группе получавшей MediSpheres, содержащие тобрамицин выжило 60 % животных при 100 % летальности в остальных.

Cullen A.B. и соавт. [24] на модели ягнят с инфекционным поражением легких провели сравнение внутрилегочного введения суспензии PulmoSpheres[™] микрочастиц гентамицина в ПФОБ (LiquiVent[®], Alliance Pharmaceutical Corp, США) либо в начале (метод «медленного заполнения»), либо во время ЧЖВЛ (метод «верхнего заполнения»), с внутривенным введением антибиотика во время ИВЛ. В экспериментах была использована суспензия микрочастиц гентамицина в перфтор-N-бутилэтаноле (3 мг/мл). При обоих способах гентамицин вводился однократно в дозе 5 мг/кг. Было установлено, что при внутривенном введении концентрация гентамицина в сыворотке крови была выше чем при внутрилегочном введении суспензии микрочастиц гентамицина в ПФОБ. В группах с внутрилегочным введением концентрация гентамицина в сыворотке крови всегда была ниже уровня, при котором антибиотик проявляет системную токсичность, в отличие от внутривенного. При этом концентрация гентамицина в ткани легких животных из группы с внутривенным введением была значительно ниже, чем с внутрилегочным. Также наблюдались различия в содержании гентамицина в сыворотке крови и в ткани легких, в зависимости от способа внутрилегочного введения. Так концентрация гентамицина в сыворотке крови достигал максимума через 15 мин после введения суспензии гентамицина в ПФОБ во время ЖВЛ методом «верхнего заполнения». В то время как при введении препарата методом «медленного заполнения», максимума уровня гентамицина в сыворотке крови не наблюдалось. При этом также наблюдалась наиболее низкая концентрация гентамицина в плазме крови и наиболее высокая в ткани легкого по сравнению с двумя другими способами введения.

В рамках работы проведенной Сох С.А. с соавт. [25] на модели поражения легких, индуцированного лаважем солевым раствором, подкисленным HCl до pH 1,45–1,47, у новорожденных ягнят изучалось влияние внутривенного и эндотрахеального

введения гентамицина (в виде смеси микрочастиц антибиотика в перфторэтане в соотношении 1 : 4, которая затем добавлялась к ПФОБ (LiquiVent®, Alliance Pharmaceutical Corp., США) для получения дозы гентамицина 5 в 20 мл/кг соответственно) на его концентрацию в ткани легкого и сыворотке крови. Было показано, что эндотрахеальное введение суспензии микрочастиц гентамицина в ПФОБ при ЧЖВЛ позволяло достичь более высокой концентрации гентамицина в тканях легких при более низком, чем при внутривенном его введении содержании в сыворотке крови, как в случае здоровых, так и пораженных легких.

Следует отметить, что на сегодняшний день технология PulmoSpheres™ представляет собой платформенное решение, которое предлагает три варианта включения фармацевтической субстанции в состав полых пористых микрочастиц, что в свою очередь даст возможность использовать их не только при проведении ЧЖВЛ с применением ПФУ жидкостей в качестве носителя, но и в составе ингаляторов сухого порошка или дозированных аэрозольных для доставки в легкие широкого спектра ЛС [26, 27].

Наряду с технологией получения полых пористых микрочастиц ЛС солюбилизирующие агенты также могут быть использованы для увеличения растворимости твердых форм лекарств в перфторуглеродах. В отличие от пролекарств, в которых флуорофильный остаток ковалентно присоединен к молекуле, солюбилизирующие агенты образуют растворимый в перфторуглеродах комплекс, нековалентно взаимодействуя с молекулой препарата. Этот подход был изучен Williams T.D. с соавт. *in vitro* с использованием фенолов в качестве модельных препаратов и ряда солюбилизирующих агентов [28]. Каждый солюбилизирующий агент содержал насыщенную фторуглеродную цепь, необходимую для обеспечения растворимости в перфторуглеродах, и карбонильную группу. Все исследованные солюбилизирующие агенты значительно повышали растворимость фенола и его производных в ПФОБ. Однако, несмотря на полученные положительные результаты, предложенный подход имеет ряд ограничений, которые могут значительно затруднить его использование в клинической практике: положительный эффект был получен на ограниченном классе соединений с использованием большого количества солюбилизирующего агента.

Обратные эмульсии типа «вода–в–ПФУ жидкости». Использование

обратных эмульсий типа «вода–в–ПФУ жидкости» представляет собой многообещающий способ таргетной доставки препаратов в легкие ввиду того, что они могут позволить добиться более равномерного и воспроизводимого распределения ЛС по сравнению с суспензиями. Кроме того приготовление суспензии микрочастиц ЛС в ПФУ жидкостях является весьма трудоемким и требует специального оборудования, поэтому искомый препарат должен переводиться в форму микрочастиц заблаговременно. В свою очередь приготовление эмульсий водных растворов ЛС в ПФУ жидкостях, как правило, не сопряжено с подобными сложностями.

Следует отметить, что как суспензии, так и эмульсии водных растворов ЛС в перфторуглеродах поступая в легкие будут непосредственно взаимодействовать с водной фазой выстилающей их (мукус, бактериальные биопленки и др.), в процессе чего они будут не только растворяться в ней но и распространяться с ее помощью посредством пассивной диффузии. При этом в случае эмульсий благодаря тому, что ЛС находится в водном растворе внутри ПФУ жидкости существует возможность контролировать концентрацию препарата в этом растворе и, таким образом, изучать его кинетику в легких.

Jung R. и соавт. [29] в опытах *in vitro* продемонстрировали, что комбинация ПФОБ и ряда аминогликозидов (тобрамицина, гентамицина и амикацина) может оказывать синергетическое антибактериальное действие. Методом оценки кривых гибели бактерий исследователи определяли антибактериальный эффект при инкубации инокулятов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 с ПФОБ, растворами отдельных антибиотиков в бульоне Мюллера–Хинтона и комбинациями каждого из них с перфторуглеродом. По результатам работы было установлено, что комбинация ПФОБ с каждым из аминогликозидов оказывала более мощный бактериостатический эффект, чем при использовании каждого из активных агентов по отдельности.

Zelinka M.A. и соавт. [30] было проведено сравнительное исследование содержания гентамицина в сыворотке крови и тканях легких здоровых новорожденных ягнят при эндотрахеальном и внутривенном его введении в эквивалентных дозах во время ЧЖВЛ с использованием ПФД (APF-140, Air Products and Chemicals, Inc., США). Было установлено, что в группе с внутривенным введением уровень гентамицина в сыворотке крови достигал максимума сразу после введения и в дальнейшем снижался по мере его выведения почками. В свою очередь в случае внутрилегочного введения,

уровень гентамицина в сыворотке достигал максимума через 1,5 часа, и оставался относительно постоянным в течение нескольких часов. При этом, содержание гентамицина в сыворотке крови было ниже клинического порога нефротоксичности (~12 мкг/мл) на протяжении всего периода наблюдения в обеих группах. Через 6 часов после введения концентрация гентамицина в крови животных, принимавших антибиотик в ходе ЧЖВЛ, была выше, чем в группе, получавшей его внутривенно. Таким образом, по результатам исследования был сделан вывод о том, что при эндотрахеальной доставке антибиотика в виде эмульсии типа «вода–в–ПФУ жидкости» удастся достигать большей концентрации препарата в тканях легких при более равномерном распределении его между долями легких по сравнению с внутривенным введением.

В свою очередь Fox W.W. и соавт. [31] было проведено сравнение двух способов доставки антибиотика при поражении легких вызванном лаважом солевым раствором, у новорожденных ягнят: 1) ИВЛ с внутривенным введением гентамицина; 2) внутрилегочное введение гентамицина во время ЧЖВЛ. В результате эксперимента было выявлено, что ЧЖВЛ с эмульсией гентамицина в ПФОБ приводит к значительно более высокому его содержанию в легочной ткани по сравнению с внутривенным введением, а достигаемые уровни антибиотика в сыворотке крови были сопоставимы для обоих способов введения. При этом общее содержание гентамицина в тканях легких через 4 часа после эндотрахеального введения в ходе ЧЖВЛ было примерно в 5 раз выше по сравнению с тем, которое достигалась при внутривенном введении.

Аналогичные данные были получены Jeng M.J. и соавт. [32] при сравнении внутривенного и эндотрахеального (в виде эмульсии в ПФУ жидкости) способов доставки ванкомицина в легкие на модели синдрома аспирации мекония у новорожденных поросят. В первой группе животным однократно вводили внутривенно ванкомицин в дозе 15 мг/кг с последующей ИВЛ. Во второй группе поросятам сперва вводили через эндотрахеальную трубку эмульсию, содержащую перфтор-1,3,5-триметил-циклогексан (5 мл/кг; F2 Chemicals Ltd., Великобритания) и ванкомицин (15 мг/кг), после чего в течение 5–10 мин проводили полную жидкостную вентиляцию легких. В результате работы было установлено, что содержание ванкомицина в сыворотке крови поросят, которые получали антибиотик эндотрахеально, была значительно ниже, чем у получавших препарат внутривенно. При этом концентрация

ванкомицина в тканях легких ($198,9 \pm 72,5$ мкг/г сухой ткани) была достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с группой с его внутривенным введением ($134,9 \pm 39,1$ мкг/г сухой ткани).

Nakazawa K. и соавт. в работе [33] оценивали влияние эндотрахеального введения простагландина E_1 (PGE_1) на показатели газообмена и гемодинамические параметры при ЧЖВЛ у половозрелых японских белых кроликов с острым респираторным дистресс синдромом (ОРДС), индуцированным внутривенным введением олеиновой кислоты. По результатам исследования было установлено, что по сравнению с другими группами (ИВЛ; введение PGE_1 в виде аэрозоля в сочетании с ИВЛ; ЧЖВЛ с ПФОБ) только для группы, в которой осуществлялось эндотрахеальное введение солевого раствора PGE_1 (20 мкг/мл) после проведения ЧЖВЛ с ПФОБ, наблюдалось статистически значимое снижение среднего давления в легочной артерии и увеличение парциального давления кислорода в артериальной крови. Также Nakazawa K. и соавт. [34] на аналогичной модели кроликов с ОРДС, было показано, что при сочетании ЧЖВЛ с ПФОБ как с аэрозольной формой доставки простациклина, так и с эндотрахеальным введением его раствора в глициновом буфере, удастся добиться в целом сравнимого улучшения показателей газообмена и снижения среднего давления в легочной артерии.

Известно, что нарушения в системе легочного сурфактанта приводят к альвеолярному коллапсу с развитием острой дыхательной недостаточностью. В свою очередь введение экзогенного сурфактанта в комбинации с ЧЖВЛ с использованием перфторуглерода представляется перспективным способом лечения поражений легких, ввиду возможности сочетания открытия ателектатических областей легких с внесением в них сурфактанта. Для подтверждения этой гипотезы в экспериментах на животных исследователи вводили сурфактант в легкие как после [35], так и до проведения ЧЖВЛ [36, 37, 38, 39, 40, 41]. Однако полученные результаты были противоречивыми, так как в ряде работ отмечалось, что эффективность терапии с использованием ЧЖВЛ была ниже, чем при комбинации ИВЛ и введения сурфактанта.

В работе Burkhardt W. и соавт. [42] предложили применять эмульсии типа «ПФУ жидкость–сурфактанте» (PerSurf) для использования достоинств каждого из компонентов смеси. Эксперименты проводили на крысах линии Вистар с индуцированным лаважом поражением легких. В качестве сурфактанта использовали

CurosurfTM, а также три различных перфторуглерода: PF5080 (3M, Германия), Rimar 101 (Miteni, Италия) и ПФОБ (ABCR, Германия). Эмульсии PerSurf во всех перфторуглеродах были стабильны более 48 часов, в то время как эмульсии типа «сурфактант–в–ПФУ жидкости» быстро коалесцировали и, в связи с этим были исключены из исследования. Введение сурфактанта в виде эмульсии PerSurf приводило к увеличению парциального давления кислорода в артериальной крови животных приблизительно на том же уровне, что и при их раздельном использовании. Кроме того, по результатам гистологических исследований было установлено, что распределение сурфактанта в легких животных из группы PerSurf было более однородным, чем у получавших только сурфактант.

Как и в случае с малыми лекарственными молекулами, однородное распределение генного вектора при введении его в дыхательные пути является одной из основных проблем, связанных с генной терапией врожденных и приобретенных заболеваний легких. В ряде исследований было продемонстрировано, что различные перфторуглероды (ПФОБ, FC-75, FC-80) могут способствовать равномерному распределению рекомбинантных вирусных векторов в легких мышей [43, 44, 45, 46, 47], крыс [48], кроликов [49] и нечеловекоподобных приматов [50] при их эндотрахеальном введении в виде водных суспензий. Несмотря на то, что в этих работах генетические вектора не доставлялись в легкие непосредственно с помощью перфторуглеродов (которые вводили сразу после введения последних), однако последние способствовали более эффективному их распространению в легких. По результатам исследований отмечалось увеличение экспрессии генов в легких и улучшение распределения *in situ* экспрессии генов внутри и между долями легкого, независимо от вида животного и/или используемого генного вектора. Кроме того, использование ПФУ жидкостей приводило к более ранней экспрессии введенных генов и возможности использования меньшего количества вектора для достижения терапевтически значимого эффекта. Также отмечалось, что перфторуглероды быстро снижали трансэпителиальное сопротивление и, тем самым, увеличивали степень проникновения вирусных векторов в клетки эпителия и экспрессию генов. Немаловажным представляется и тот факт, что в указанных исследованиях отмечался более высокий уровень экспрессии генов в дистальных отделах нижних дыхательных путей и альвеолярном эпителии по сравнению с введением только водной суспензии

вирусного вектора.

Несмотря на то, что ряд описанных выше исследований *in vivo* наглядно демонстрирует, что при использовании эмульсии водного раствора ЛС в ПФУ жидкостях наблюдается достаточно однородное их распределение в тканях легких, низкая стабильность результирующей эмульсии затрудняет возможность контролировать дозу введенного препарата, что значительно ограничивает этот подход как с фармацевтической, так и с клинической точки зрения. Для стабилизации водных капель с целью создания субмикронных эмульсий типа «вода–в–ПФУ жидкости» с узким диапазоном распределения частиц прибегают к использованию эмульгаторов [51, 52, 53].

Интересной представляется работа Franz A.R. и соавт. [54] в которой исследовали фармакокинетику антибиотиков в плазме и тканях легких новозеландских белых кроликов после эндотрахеального введения во время ЧЖВЛ эмульсий гентамицина и ванкомицина в ПФД (Sigma-Aldrich, Германия), стабилизированных натуральным бычьим сурфактантом (Alveofact, Boehringer Ingelheim, Германия). Исследование было выполнено как на интактных кроликах, так и на животных с ОРДС, создаваемым лаважом соляным раствором. Было выявлено, что концентрация антибиотиков в плазме после внутривенного введения достигала максимума в конце их инфузии (через 15 мин). При внутрилегочном введении концентрация в плазме крови для обоих антибиотиков не достигала пиковых уровней, наблюдаемых при внутривенном введении, и, в случае ванкомицина, максимум содержания наблюдался в более поздние сроки (через 30 мин). При этом содержание антибиотиков в тканях легких было в 23,5 (для гентамицина) и в 23,2 (для ванкомицина) раза выше, чем при внутривенном введении.

Несмотря на многообещающие результаты и хорошую биосовместимость натурального сурфактанта, на сегодняшний день он не получил широкого распространения в качестве стабилизатора эмульсий водных растворов ЛС в перфторуглеродах. В свою очередь, ввиду одновременно липо- и гидрофобных свойств ПФУ жидкостей, а также требований к биосовместимости эмульгатора, набор подходящих синтетических фторсодержащих сурфактантов значительно ограничен. Среди наиболее изученных и часто используемых эмульгаторов следует отметить фторсодержащие производные диморфоинофосфата (F_nC_mDMP ; $n = 4, 6, 8, 10$ и $m = 2$,

5, 11) [55, 56] и триблок-сополимер перфторполиэфирного масла Krytox 157FS (DuPont) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) [57]. В литературе [58] также описаны еще несколько типов фторсодержащих сурфактантов, которые помогают стабилизировать обратные эмульсии типа «вода–в–ПФУ жидкости», на основе полиоксиэтилен перфторалкилов $C_mF_{2m+1}-(CH_2)_n-(OCH_2CH_2)_pOH$ ($m = 4, 6, 7$; $n = 1$; $p = 4, 5, 6$), полиоксиэтилен тиоперфторалкилов $C_mF_{2m+1}-C_2H_4-S-C_2H_4(OCH_2CH_2)_pOH$ ($m = 6$; $p = 2, 3, 5, 7$), перфтороктановой кислоты и её эфира $C_7F_{15}-CO-(OCH_2CH_2)_mOCH_3$ ($m = 7.2$), а также $C_nF_{2n+1}-CH_2-O-SO_2-NHCONH-C(CH_2OH)_3$, однако исследования по их биосовместимости в настоящее время не проводились.

Sadtler V.M. и соавт. [59] продемонстрировали, что при использовании $F_8C_{11}DMP$ в качестве эмульгатора можно добиться получения устойчивых обратных эмульсий типа «вода–в–ПФУ жидкости» с субмикронным размером капель для водных растворов целого ряда лекарственных средств, включая антибиотики (доксациклин, гентамицин, эритромицин), вазоактивные бронхолитики (эпинефрин, толазолин), муколитические средства (ацетилцистеин), противотуберкулезные средства (этамбутол, пипразинамид), холинергические (ацетилхолина хлорид), глюкокортикоидные (преднизолон) и противоопухолевые средства (циклофосфамид).

Ferguson S.K. и соавт. [60] в экспериментах на крысах линии Sprague Dawley продемонстрировали, что в случае внутрилегочного введения эмульсии, содержащей $F_8C_{11}DMP$ (сурфактант), амбризентан (вазодилататор) и ПФОБ (Fluoromed, L.P., США), наблюдалось снижение артериального давления в легочной вене на 20–30 % по сравнению с контрольной группой при острой гипоксии.

В свою очередь Butz N. и соавт. [61] продемонстрировали, что обратные эмульсии типа «вода–в–ПФУ жидкости», стабилизированные $F_8C_{11}DMP$, могут находить применение также в дозированных аэрозольных ингаляторах. На примере кофеина авторы выявили, что при распылении обратных эмульсий водных растворов в ПФОБ (Alliance Pharmaceutical Corp., США), содержащих $F_8C_{11}DMP$ в качестве эмульгатора, количество обнаруживаемого кофеина в высушенном остатке было практически одинаковым после каждого акта пульверизации. При этом, эмульсии оставались стабильными (размер капель 200 ± 20 нм) как минимум в течение недели после хранения в сосуде под давлением.

Courrier H.M. и соавт. [62] в экспериментах на мышах линии BALB/c оценивали

влияние интраназальных инстилляций эмульсии водного раствора инсулина в ПФОБ (Alliance Pharmaceutical Corp., США), содержащей F₈C₁₁DMP, на целостность легочной ткани и уровень глюкозы в крови. Было установлено, что введение эмульсий инсулина в ПФОБ, стабилизированных F₈C₁₁DMP, позволяло эффективно снижать уровень глюкозы в крови (на 70 % от общего ее содержания за 40 мин). Эмульсии не изменяли целостность легочной ткани, однако у мышей наблюдалось преходящее снижение массы тела в течение 3–4 дней после первой инстилляции. Следует также отметить, что эмульсии оставались стабильными (размер капель 115 ± 8 нм) при хранении их в течение двух недель при комнатной температуре.

В серии работ, проведенных Orizondo R.A. и соавт., исследователи оценивали стабильность и антибактериальную активность стабилизированных эмульсий тобрамицина в перфторуглеродах при варьировании процентного соотношения компонентов смеси, а также фармакокинетические профили антибиотика при его эндотрахеальном введении в виде эмульсии во время ЧЖВЛ [63, 64, 65]. Было установлено, что эмульсии тобрамицина в смеси перфторциклоэфир/перфтороктан (FC-770, 3M Inc., США), стабилизированные комбинацией перфторполиэфирного масла Krytox 157FSL и триблок-сополимера FSL-ПЭГ-FSL (Krytox 157FSL, молекулярная масса = 2500 Да, $n = 13$; ПЭГ, молекулярная масса = 3350 Да, $m = 75$), характеризовались практически идентичными значениями вязкости и поверхностного натяжения по сравнению с чистым FC-770, а размер водных капель был стабилен в течение 24 часов [63]. Кроме того, эмульсии тобрамицина в ПФУ жидкости эффективно подавляли рост бактерий при их инкубации в течение 2 часов с биопленками *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853. Также в эксперименте на самцах крыс линии Sprague Dawley сравнили фармакокинетические профили тобрамицина при использовании аэрозольного способа доставки и эндотрахеальном введении в виде эмульсии в ПФУ жидкости во время ЧЖВЛ. В результате было установлено, что содержание антибиотика в легких в случае использования ЧЖВЛ было в 2,5 и 10 раз больше через 1 и 4 часа после введения, чем при аэрозольном способе. При этом концентрация тобрамицина в плазме крови при ЧЖВЛ была достоверно меньше ($p < 0,05$), чем при использовании аэрозоля.

В дальнейшем Orizondo R.A. и соавт. [64] опираясь на полученные результаты и используя тот же эмульгатор, определили при фиксированных объемной концентрации

водной фазы (V_{aq} – 2,5 %) и тобрамицина в ней (C_t – 40 мг/мл) минимальную концентрацию сурфактанта (C_{fs} – 15 мг/мл; отношение массы сурфактанта к объему водной фазы), при которой получаемые эмульсии были стабильны в течение не менее чем 4 часов. После чего авторами были оценены фармакокинетические профили антибиотика при аэрозольной терапии и эндотрахеальном введении в виде эмульсии в ПФУ жидкости во время ЧЖВЛ при варьировании значений V_{aq} (1–5 %), C_t (20–100 мг/мл) и C_{fs} (15 и 48 мг/мл H_2O). Было установлено, что при использовании эмульсий в перфторуглероде содержание антибиотика в тканях легких через 4 часа после введения оказывалось в 5–22 раз выше, чем в случае аэрозольного способа доставки ЛС. При этом на увеличение содержания тобрамицина в легких наибольшее влияние оказывало увеличение V_{aq} (при пропорциональном уменьшении C_t) и в меньшей степени увеличение C_{fs} .

Наконец работа опубликованная Orizonzo R.A. и соавт. [65] в 2017 году была посвящена выбору сурфактанта и подбору значения C_{fs} , при котором обеспечивалась бы не только оптимальная степень перехода ЛС из водных капель эмульсии в ткани легких, но и минимальная токсичность. Наряду с ранее исследованной комбинацией блок-сополимера FSL-ПЭГ-FSL и перфторполиэфирного масла Krytox 157FSL, которое имеет в своем составе свободные карбоксильные группы, обладающие потенциальной реактивностью при использовании *in vivo*, авторы также протестировали в качестве сурфактанта и модифицированный сополимер FSH-ПЭГ-FSH, синтезированный по такой же схеме, но с использованием перфторполиэфирного масла с более высокой молекулярной массой (Krytox 157FSH, молекулярная масса = 7000–7500 Да, $n = 41$) и меньшим по массе блоком ПЭГ (молекулярная масса = 1000 Да, $m = 22$). По результатам экспериментов было установлено, что наибольшая эффективность переноса тобрамицина из эмульсии на поверхность биопленок достигалась при промежуточной концентрации сурфактанта: при более низких значениях C_{fs} эмульсия была нестабильна и водная и ПФУ фазы быстро разделялись, а при более высоких C_{fs} водные капли эмульсии обладали избыточной стабильностью и не коалесцировали с водной поверхностью биопленки. Максимальная степень перехода антибиотика из эмульсии наблюдалась при C_{fs} равном 2 или 10 мг/мл для FSH-ПЭГ-FSH и FSL-ПЭГ-FSL+FSL, соответственно. При этом эмульсии с FSH-ПЭГ-FSH в эксперименте с альвеолярными базальными эпителиальными клетками человека

продemonстрировали отсутствие цитотоксических эффектов. На основании чего авторы сделали вывод в соответствии с которым сурфактант FSH-ПЭГ-FSH является наиболее перспективным эмульгатором водных растворов ЛС при формировании эмульсий в ПФУ жидкостях.

Сурфактант FSH-ПЭГ-FSH был также использован и Nelson D.L. с соавт. [66] при сравнении эффективности доставки фактора роста – лизофосфатидной кислоты (ЛФК), в мышинные альвеолярные эпителиальные клетки при их инкубации с эмульсиями ЛФК в ПФУ жидкости или водными растворами ЛФК с различной концентрацией действующего вещества (0–10 мкмоль/л). Было установлено, что миграция клеток достоверно увеличивалась ($p < 0,001$) при их инкубации с эмульсиями, содержащими 10 мкмоль/л ЛФК, однако схожий достигался и при использовании водного раствора ЛФК с концентрацией 5 мкмоль/л. При этом обработка альвеолярных эпителиальных клеток водными растворами ЛФК приводила к увеличению их барьерной функции и пролиферации, в отличие от тех случаев, где были применены эмульсии в перфторуглеродах. Авторы предположили, что клеточный ответ на введение ЛС в легкие в виде эмульсий в ПФУ жидкости может отличаться в зависимости от свойств препарата и того действия, которое он оказывает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наибольший интерес к исследованиям по использованию ПФУ жидкостей для адресной доставки ЛС непосредственно в легкие приходится на конец 90-х начало 00 годов XX века. Это было обусловлено желанием максимально повысить эффективность ЧЖВЛ, которая рассматривалась в качестве нового многообещающего метода лечения тяжелой бронхолегочной патологии у взрослых и педиатрических пациентов. Однако, внедрение последнего в клиническую практику откладывалось из-за отсутствия абсолютных доказательств его эффективности при лечении тяжелой бронхолегочной патологии как у взрослых [67], так и у новорожденных [68]. Вероятно, в этой связи снизилась и активность исследований по изучению адресной доставке различных ЛС с использованием ПФУ жидкостей в качестве их носителя. Кроме того, в США было принято решение о приостановке клинических исследований с использованием перфлуброна, являвшегося одним из основных перфторуглеродов, используемых для создания эмульсий ЛС, до получения особого разрешения. И на сегодняшний день использование ЧЖВЛ, по крайней мере в качестве самостоятельного

метода лечения тяжелой бронхолегочной патологии взрослых и новорожденных, находится под большим вопросом [69].

Тем не менее, вопрос об использовании ПФУ жидкостей для адресной доставки ЛС остается не только открытым, но и наполняется новым содержанием. Это связано с тем, что основным методом введения ЛС непосредственного в пораженные участки стала инстилляционная их в легкие во время (для новорожденных и недоношенных детей) или после (для детей старшего возраста и взрослых) бронхоальвеолярного лаважа. Указанный подход позволяет не только адресно ввести лекарственные препараты, но и создать оптимальные условия для реализации их фармакологического действия. Это достигается путем очистки пораженных участков от биологического материала, затрудняющего проникновение ЛС не только в ткань легкого, но и в легочный кровотока и лимфоток. Также можно сформулировать предварительные требования к эмульсиям ЛС в ПФУ в зависимости от фармакологической группы используемых лекарственных средств. При этом основным показателем является стабильность эмульсии ЛС в ПФУ, в соответствии с которой их можно разделить две основные группы: нестабильные и стабильные.

Основной задачей нестабильных эмульсий является обеспечение введения ЛС непосредственно в целевую (пораженную) зону легкого до момента их деэмульгирования. К ЛС, требующим создания подобных эмульсий могут быть отнесены пептиды, гены, клеточные элементы и стволовые клетки, а для некоторых клинических ситуаций гормоны, сосудистые препараты и антибиотики. Основным требованием к нестабильным эмульсиям ЛС является простота их приготовления и соответственно использования (без применения специального лабораторного оборудования). То есть возможность приготовления эмульсий ЛС в ПФУ жидкостях *ex tempore* методом ручного встряхивания прямо у постели больного.

В свою очередь применение стабильных эмульсий ЛС обосновано в том случае, если необходима не только адресная доставка препарата в пораженные участки легких, но и длительное поддержание в них высоких концентраций действующего вещества. К подобным лекарственным препаратам могут быть отнесены антибиотики, гормоны, бронходилататоры и сосудистые препараты.

Проведенный анализ литературных источников свидетельствует о том, что в настоящее время разработаны все необходимые подходы для создания как

нестабильных, так и стабильных эмульсий лекарственных средств с различными физико-химическими свойствами из различных фармакологических групп в ПФУ жидкостях для их таргетной доставки в целевые зоны легких во время или после лечебного бронхоальвеолярного лаважа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett W.D., Brown J.S., Zeman K.L. et al. Targeting delivery of aerosols to different lung regions. *J. Aerosol. Med.* 2002; 15(2): 179–188. doi: 10.1089/089426802320282301.
2. Rocha G. Inhaled Pharmacotherapy for Neonates: A Narrative Review. *Turk Arch Pediatr* 2022; 57: 5–17 DOI: 10.5152/TurkArchPediatr.2021.21125
- 3 . Бонитенко Е.Ю., Белякова Н.А., Баринов В.А. и др. Применение перфторуглеродов при лечении тяжелой бронхолегочной патологии. Часть I: классификация методов (аналитический обзор). *Медлайн.ру (Medline.ru)*. 2023; 24: 1368–1397.
- 4 . Wolfson M.R., Shaffer T.H. Liquid ventilation: an adjunct for respiratory management. *Paediatr Anaesth.* 2004; 14(1): 15–23. doi: 10.1046/j.1460-9592.2003.01206.x
5. Wolfson M.R., Shaffer T.H. Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatr. Respir. Rev.* 2005; 6(2): 117–127. doi: 10.1016/j.prrv.2005.03.010.
6. Lehmler H.J. Perfluorocarbon compounds as vehicles for pulmonary drug delivery. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2007; 4(3): 247–262. doi: 10.1517/17425247.4.3.247.
7. Alapati D., Shaffer T.H. Administration of drugs/gene products to the respiratory system: A historical perspective of the use of inert liquids. *Front. Physiol.* 2022; 13: 871893. doi: 10.3389/fphys.2022.871893.
- 8 . Tremper K.K., Zaccari J., Cullen B.F., Hufstedler S.M. Liquid-gas partition coefficients of halothane and isoflurane in perfluorodecalin, fluosol-DA, and blood/fluosol-DA mixtures. *Anesth. Analg.* 1984; 63(7): 690–692.
- 9 . Kimless-Garber D.B., Wolfson M.R., Carlsson C., Shaffer T.H. Halothane administration during liquid ventilation. *Respir. Med.* 1997; 91(5): 255–262. doi: 10.1016/s0954-6111(97)90028-7.
10. Schubert K.V., Kaler EW. Microemulsifying fluorinated oils with mixtures of

fluorinated and hydrogenated surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1994; 84(1): 97–106. doi: 10.1016/0927-7757(93)02704-I.

11. Hsu C.H., Jay M., Bummer P.M., Lehmler H.J. Chemical stability of esters of nicotinic acid intended for pulmonary administration by liquid ventilation. *Pharm Res*. 2003; 20(6): 918–925. doi: 10.1023/a:1023899505837.

12. Gurujeyalakshmi G., Wang Y., Giri S.N. Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric Oxide*. 2000; 4(4): 399–411. doi: 10.1006/niox.2000.0297

13. Venkatesan N., Chandrakasan G. In vivo administration of taurine and niacin modulate cyclophosphamide-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol*. 1994; 292(1): 75–80. doi: 10.1016/0926-6917(94)90028-0.

14. Lehmler H.J., Xu L., Vyas S.M. et al. Synthesis, physicochemical properties and in vitro cytotoxicity of nicotinic acid ester prodrugs intended for pulmonary delivery using perfluorooctyl bromide as vehicle. *Int. J. Pharm*. 2008; 353(1-2): 35–44. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.011

15. Shaffer T.H., Wolfson M.R., Greenspan J.S. et al. Perfluorochemical liquid as a respiratory medium. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol*. 1994; 22(2): 315–326. doi: 10.3109/10731199409117423.

16 . Wolfson M.R., Greenspan J.S., Shaffer T.H. Pulmonary administration of vasoactive substances by perfluorochemical ventilation. *Pediatrics*. 1996; 97(4): 449–455.

17. Brunelli L., Hamilton E., Davis J.M. et al. Perfluorochemical liquids enhance delivery of superoxide dismutase to the lungs of juvenile rabbits. *Pediatr. Res*. 2006; 60(1): 65–70. doi: 10.1203/01.pdr.0000219392.73509.70.

18 . Wolfson M.R., Enkhbaatar P., Fukuda S. et al. Perfluorochemical-facilitated plasminogen activator delivery to the airways: A novel treatment for inhalational smoke-induced acute lung injury. *Clin. Transl. Med*. 2020; 10(1): 258–274. doi: 10.1002/ctm2.26.

19. Dellamary L.A., Tarara T.E., Smith D.J. et al. Hollow porous particles in metered dose inhalers. *Pharm. Res*. 2000; 17(2): 168–174. doi: 10.1023/a:1007513213292.

20. Weers J.G. Dispersible powders for inhalation applications. *Innov. Pharm. Tech*. 2000, 1(7): 111–116.

21. Smith D.J., Gambone L.M., Tarara T. et al. Liquid dose pulmonary instillation of gentamicin PulmoSpheres formulations: tissue distribution and pharmacokinetics in rabbits.

Pharm. Res. 2001; 18(11): 1556–1561. doi: 10.1023/a:1013078330485.

22. Dickson E.W., Heard S.O., Tarara T.E. et al. Liquid ventilation with perflubron in the treatment of rats with pneumococcal pneumonia. Crit. Care Med. 2002; 30(2): 393–395. doi: 10.1097/00003246-200202000-00021.

23. Dickson E.W., Doern G.V., Trevino L. et al. Prevention of descending pneumonia in rats with perflubron-delivered tobramycin. Acad. Emerg. Med. 2003; 10(10): 1019–1023. doi: 10.1111/j.1553-2712.2003.tb00567.x.

24. Cullen A.B., Cox C.A., Hipp S.J. et al. Intra-tracheal delivery strategy of gentamicin with partial liquid ventilation. Respir. Med. 1999; 93: 770–778. doi: 10.1016/s0954-6111(99)90261-5.

25. Cox C.A., Cullen A.B., Wolfson M.R., Shaffer T.H. Intratracheal administration of perfluorochemical–gentamicin suspension: A comparison to intravenous administration in normal and injured lungs. Pediatr. Pulmonol. 2001; 32: 142–151. doi: 10.1002/ppul.1100.

26. Weers J.G., Tarara T.E. The PulmoSphere™ platform for pulmonary drug delivery. Ther Deliv. 2014; 5(3): 277–295. doi: 10.4155/tde.14.3.

27. Weers J.G., Miller D.P., Tarara T.E. Spray-dried PulmoSphere™ formulations for inhalation comprising crystalline drug particles. AAPS PharmSciTech. 2019; 20(3): 103. doi: 10.1208/s12249-018-1280-0

28. Williams T.D., Jay M., Lehmler H.J. et al. Solubility enhancement of phenol and phenol derivatives in perfluorooctyl bromide. J. Pharm. Sci. 1998; 87(12): 1585–1589. doi: 10.1021/js980156l

29. Jung R., Pendland S.L., Martin S.J. Combined bactericidal activity of perfluorooctyl bromide and aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50(6): 939–944. doi: 10.1093/jac/dkf226

30. Zelinka M.A., Wolfson M.R., Calligaro I. et al. A comparison of intratracheal and intravenous administration of gentamicin during liquid ventilation. Eur. J. Pediatr. 1997; 156(5): 401–404. doi: 10.1007/s004310050625.

31. Fox W.W., Weis C.M., Cox C. et al. Pulmonary administration of gentamicin during liquid ventilation in a newborn lamb lung injury model. Pediatrics. 1997; 100(5): E5. doi: 10.1542/peds.100.5.e5.

32. Jeng M.J., Lee Y.S., Soong W.J. Effects of perfluorochemicals for intrapulmonary vancomycin administration and partial liquid ventilation in an animal model of meconium-

injured lungs. *Acta Paediatr. Taiwan*. 2007; 48(6): 309–316.

33 . Nakazawa K., Uchida T., Matsuzawa Y. et al. Treatment of pulmonary hypertension and hypoxia due to oleic acid induced lung injury with intratracheal prostaglandin E1 during partial liquid ventilation // *Anesthesiology*. 1998; 89(3): 686–692. doi: 10.1097/00000542-199809000-00019.

34. Nakazawa K., Yokoyama K., Matsuzawa Y. et al. Pulmonary administration of prostacyclin (PGI₂) during partial liquid ventilation in an oleic acid-induced lung injury: inhalation of aerosol or intratracheal instillation? *Intensive Care Med*. 2001; 27(1): 243–250. doi: 10.1007/s001340000756.

35 . Mrozek J.D., Smith K.M., Simonton S.C. et al. Perfluorocarbon priming and surfactant: physiologic and pathologic effects. *Crit. Care Med*. 1999; 27(9): 1916–1922. doi: 10.1097/00003246-199909000-00033.

36. Wolfson M.R., Kechner N.E., Roache R.F. et al. Perfluorochemical rescue after surfactant treatment: effect of perflubron dose and ventilatory frequency. *J. Appl. Physiol*. 1998; 84(2): 624–640. doi: 10.1152/jappl.1998.84.2.624

37. Hartog A., Vazquez de Anda G.F., Gommers D. et al. Comparison of exogenous surfactant therapy, mechanical ventilation with high end-expiratory pressure and partial liquid ventilation in a model of acute lung injury. *Br. J. Anaesth*. 1999; 82(1): 81–86. doi: 10.1093/bja/82.1.81.

38 . Bendel-Stenzel E.M., Smith K.M., Simonton S.C. et al. Surfactant and partial liquid ventilation via conventional and high-frequency techniques in an animal model of respiratory distress syndrome. *Pediatr. Crit. Care Med*. 2000; 1(1): 72–78. doi: 10.1097/00130478-200007000-00014

39. Chappell S.E., Wolfson M.R., Shaffer T.H. A comparison of surfactant delivery with conventional mechanical ventilation and partial liquid ventilation in meconium aspiration injury. *Respir. Med*. 2001; 95(7): 612–617. doi: 10.1053/rmed.2001.1114.

40 . Wolf S., Lohbrunner H., Busch T. et al. Small dose of exogenous surfactant combined with partial liquid ventilation in experimental acute lung injury: effects on gas exchange, haemodynamics, lung mechanics, and lung pathology. *Br. J. Anaesth*. 2001; 87(4): 593–601. doi: 10.1093/bja/87.4.593

41 . Jeng M.J., Kou Y.R., Sheu C.C., Hwang B. Effects of exogenous surfactant supplementation and partial liquid ventilation on acute lung injury induced by wood smoke

inhalation in newborn piglets. *Crit. Care Med.* 2003; 31(4): 1166–1174. doi: 10.1097/01.CCM.0000059312.90697.32

42. Burkhardt W., Kraft S., Ochs M. et al. Persurf, a new method to improve surfactant delivery: a study in surfactant depleted rats. *PLoS One.* 2012; 7(10) :e47923. doi: 10.1371/journal.pone.0047923.

43. Weiss D.J., Strandjord T.P., Jackson J.C. et al. Perfluorochemical liquid-enhanced adenoviral vector distribution and expression in lungs of spontaneously breathing rodents. *Exp. Lung Res.* 1999; 25(4): 317–333. doi: 10.1080/019021499270222.

44 . Weiss D.J., Strandjord T.P., Liggitt D., Clark J.G. Perflubron enhances adenovirus-mediated gene expression in lungs of transgenic mice with chronic alveolar filling. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10(14): 2287–2293. doi: 10.1089/10430349950016933.

45 . Weiss D.J., Bonneau L., Allen J.M. et al. Perfluorochemical liquid enhances adeno-associated virus-mediated transgene expression in lungs. *Mol. Ther.* 2000; 2(6): 624–630. doi: 10.1006/mthe.2000.0207.

46. Weiss D.J., Beckett T., Bonneau L. et al. Transient increase in lung epithelial tight junction permeability: an additional mechanism for enhancement of lung transgene expression by perfluorochemical liquids. *Mol. Ther.* 2003; 8(6): 927–935. doi: 10.1016/j.ymthe.2003.09.003.

47 . Kazzaz J.A., Strayer M.S., Wu J. et al. Perfluorochemical liquid-adenovirus suspensions enhance gene delivery to the distal lung. *Pulm. Med.* 2011; 2011: 918036. doi: 10.1155/2011/918036.

48. Weiss D.J., Bonneau L., Liggitt D. Use of perfluorochemical liquid allows earlier detection of gene expression and use of less vector in normal lung and enhances gene expression in acutely injured lung. *Mol. Ther.* 2001; 3(5 Pt 1): 734–745 doi: 10.1006/mthe.2001.0321.

49. Lisby D.A., Ballard P.L., Fox W.W. et al. Enhanced distribution of adenovirus-mediated gene transfer to lung parenchyma by perfluorochemical liquid. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8(8): 919–928. doi: 10.1089/hum.1997.8.8-919.

50. Weiss D.J., Baskin G.B., Shean M.K. et al. Use of perfluorochemical liquid to enhance adenoviral-mediated gene expression in lungs of spontaneously breathing non-human primates: feasibility and initial studies. *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* 2000; 20: 235–236.

51. Krafft M.P., Riess J.G. Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and

their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie*. 1998; 80(5-6): 489–514. doi: 10.1016/s0300-9084(00)80016-4

52. Krafft M.P. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47(2-3): 209–228. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00107-7.

53. Riess J.G. Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective. *Tetrahedron*, 2002; 58: 4113–4131.

54. Franz A.R., Röhlke W., Franke R.P. et al. Pulmonary administration of perfluorodecaline-gentamicin and perfluorodecaline-vancomycin emulsions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164(9): 1595–1600. doi: 10.1164/ajrccm.164.9.2104088.

55. Sadtler V.M., Jeanneaux F., Krafft M.P. et al. Perfluoroalkylated amphiphiles with a morpholinophosphate or a dimorpholinophosphate polar head group. *New J. Chem.* 1998; 6: 609–613 doi: 10.1039/A708757H

56. Courrier H.M., Krafft M.P., Butz N. et al. Evaluation of cytotoxicity of new semi-fluorinated amphiphiles derived from dimorpholinophosphate. *Biomaterials*. 2003; 24(4): 689–696. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00407-6.

57. Holtze C., Rowat A.C., Agresti J.J. et al. Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab. Chip*. 2008; 8(10): 1632–1639. doi: 10.1039/b806706f.

58. Debbabi K., Guittard F., Eastoe J. et al. Reverse water-in-fluorocarbon microemulsions stabilized by new polyhydroxylated nonionic fluorinated surfactants. *Langmuir*. 2009; 25(16): 8919–8926. doi: 10.1021/la803579b.

59. Sadtler V.M., Krafft M.P., Riess J.G. Achieving stable, reverse water-in-fluorocarbon emulsions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996; 35: 1976–1978.

60. Ferguson S.K., Pak D.I., Hopkins J.L. et al. Pre-clinical assessment of a water-in-fluorocarbon emulsion for the treatment of pulmonary vascular diseases. *Drug Deliv.* 2019; 26(1): 147–157. doi: 10.1080/10717544.2019.1568621.

61. Butz N., Porté C., Courrier H. et al. Reverse water-in-fluorocarbon emulsions for use in pressurized metered-dose inhalers containing hydrofluoroalkane propellants. *Int. J. Pharm.* 2002; 238(1-2): 257–269. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00086-8.

62. Courrier H.M., Pons F., Lessinger J.M., Frossard N. et al. In vivo evaluation of a reverse water-in-fluorocarbon emulsion stabilized with a semifluorinated amphiphile as a drug delivery system through the pulmonary route. *Int. J. Pharm.* 2004; 282(1-2): 131–140.

doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.06.011.

63. Orizondo R.A., Babcock C.I., Fabiilli M.L. et al. Characterization of a reverse-phase perfluorocarbon emulsion for the pulmonary delivery of tobramycin. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.* 2014; 27(5): 392–399. doi: 10.1089/jamp.2013.1058.

64 . Orizondo R.A., Fabiilli M.L., Morales M.A., Cook K.E. Effects of emulsion composition on pulmonary tobramycin delivery during antibacterial perfluorocarbon ventilation. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.* 2016; 29(3): 251–259. doi: 10.1089/jamp.2015.1235.

65. Orizondo R.A., Nelson D.L., Fabiilli M.L., Cook K.E. Effects of fluorosurfactant structure and concentration on drug availability and biocompatibility in water-in-perfluorocarbon emulsions for pulmonary drug delivery. *Colloid Polym. Sci.* 2017; 295(12): 2413–2422.

66 . Nelson D.L., Zhao Y., Fabiilli M.L., Cook K.E. In vitro evaluation of lysophosphatidic acid delivery via reverse perfluorocarbon emulsions to enhance alveolar epithelial repair. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018; 169: 411–417. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.037

67. Galvin I.M., Steel A., Pinto R. et al. Partial liquid ventilation for preventing death and morbidity in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013. CD003707. doi: 10.1002/14651858.CD003707.pub3.

68 . Kaushal A., McDonnell C.G., Davies M.W. Partial liquid ventilation for the prevention of mortality and morbidity in paediatric acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013: CD003845. doi: 10.1002/14651858.CD003845.pub3.

69 . Бонитенко Е.Ю., Баринов В.А., Белякова Н.А., Буров А.А. Применение перфторуглеродов при лечении тяжелой бронхолегочной патологии. часть II: частичная жидкостная вентиляция легких (аналитический обзор). *Медлайн.ру (Medline.ru).* 2023; 24: 1494–1552.