

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА ЦЕРУЛОПЛАЗМИН

Т. А. Крайнова, Л. М. Ефремова, Л. А. Шерер, О. В. Миловидова,
Ю. К. Наумова, В. В. Анастасиев¹

Исследовали изменение оксидазной активности плазмы при внутривенном и внутримышечном введении препарата церулоплазмин (ЦП) экспериментальным животным. Установлено, что ферментативная активность ЦП не является критерием оценки его концентрации в плазме, и не всегда коррелирует с количеством экзогенно введенного ЦП. Внутримышечное введение препарата является допустимым способом изменения данного лекарственного средства.

Ключевые слова: церулоплазмин, фармакокинетика

ВВЕДЕНИЕ

Препарат церулоплазмин представляет гликопротеид α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови человека, выделяемый методом спиртового фракционирования и ионообменной хроматографии. Препарат используют в качестве антианемического и антиоксидантного средства при лечении анемий различного генеза, остеомиелита, а также в комплексной терапии опухолей [3]. Режим дозирования и продолжительность лечения разработаны для каждого вида патологии на основании данных клинических испытаний. Однако отсутствуют сведения о метаболизме и времени жизни церулоплазмينا (ЦП), вводимого в организм.

Существуют 2 формы фермента. Голо-фермент, обладающий оксидазной активностью, содержит 6 атомов меди. Потеря одного из этих атомов ведет к образованию неактивной формы — апофермента. Считают, что для реализации антиоксидантных свойств необходимо сохранение оксидазной активности церулоплазмينا, поскольку его основной биологический эффект обусловлен ингибированием реакции Фентона за счет преобразования двухвалентного железа в трехвалентное [6]. Однако получены данные о прооксидантном эффекте ЦП, выражающемся в усилении окисления липидов низкой плотности [9]. Этот эффект характерен только для голо-фермента; прооксидантное действие полностью подавляется при удалении атомов меди из молекулы ЦП. Многолетний опыт клинического применения ЦП свидетельствует об отсутствии прооксидантного действия лекарственного препарата *in vivo*. При этом, по нашим данным, основная часть препарата “церулоплазмин человека лиофилизированный” представлена апо-формой [4]. Результаты недавних ис-

следований показали, что лечебный эффект препарата не зависит от его оксидазной активности [5]. При этом более выраженный антигипоксический эффект препарата наблюдался при его введении за сутки до эксперимента.

Целью работы явилось изучение динамики изменения оксидазной активности плазмы при внутривенном и внутримышечном введении церулоплазмина экспериментальным животным.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

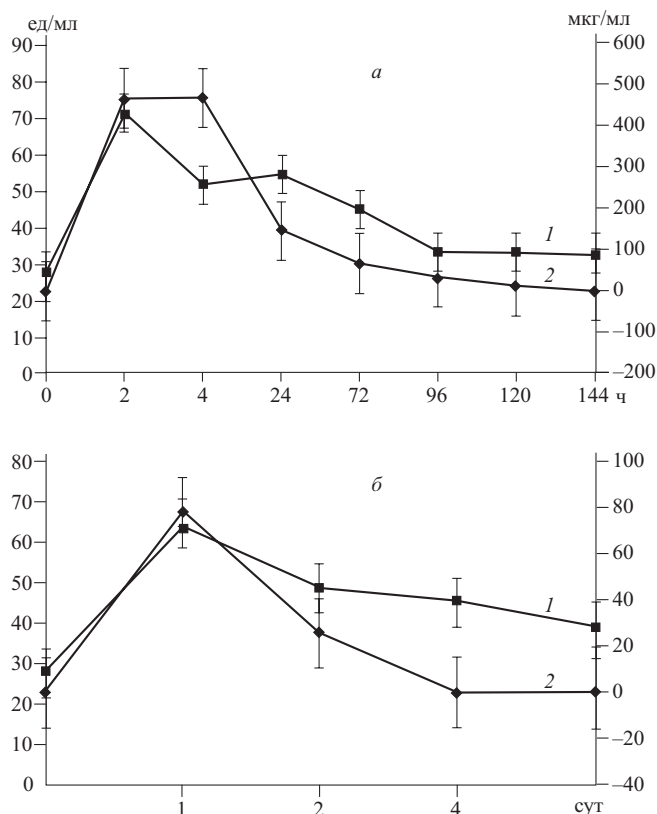
Эксперименты выполнены на кроликах породы шиншилла обоего пола массой 2,5 – 3 кг. Экспериментальные группы включали по 10 животных. Использовали препарат “церулоплазмин человека лиофилизированный для инъекций”, произведенный Нижегородским государственным предприятием по производству бактериальных препаратов. Ампулу препарата, содержащую 100 мг белка, разводили 2 мл стерильного физиологического раствора. 1 мл полученного раствора, содержащего 50 мг ЦП, вводили внутривенно и внутримышечно. Пробы крови отбирали из краевой вены уха до введения ЦП и спустя различное время после введения. Полученную плазму анализировали на предмет содержания ЦП человека и оксидазную активность.

Ферментативную активность ЦП определяли по модифицированному методу Равина [8]. В 2 пробирки вносили по 100 мкл исследуемой сыворотки и по 3,85 мл 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора, рН 5,45, предварительно нагретого до температуры 37 °С. Затем в пробирки добавляли по 2 мл раствора п-фенилендиамин-гидрохлорида (3 мг/мл), отмечая время добавления с помощью секундомера. Пробы инкубировали при температуре 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1,5 М раствора азидата натрия, спустя 5 и 15 мин после начала инкубации, добавляя азид натрия вначале в первую, затем во вторую

¹ ФГУП НПО “Микроген” Нижегородское государственное предприятие по производству бактериальных препаратов-фирма “ИмБио”, Нижний Новгород, 603950, ул. Грузинская, 44.

пробирку. Измеряли оптическую плотность проб против контрольной при длине волны 530 нм и величине оптического слоя 10 мм на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, Санкт-Петербург). Оксидазную активность рассчитывали как отношение разности оптической плотности проб с различным временем инкубации к разности времени инкубации $((D_{15} - D_5)/10)$. Единицу активности при этом определяли как количество ЦП, изменяющее оптическую плотность раствора на 0,001 в минуту. Количественное определение ЦП проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини [2]. При этом использовали моноспецифическую антисыворотку, полученную при иммунизации кроликов высокоочищенным церулоплазмином. Анализ проводили в 1 % агаровом геле ("Difco", США) в 0,1 М веронал-мединаловом буфере (рН 8,6) слоем 1 мм. В качестве контроля использовали образцы высокоочищенного ЦП со степенью очистки не менее 0,045, содержащие 100, 300 и 600 мкг/мл ЦП. Степень очистки ЦП определяли как соотношение оптических плотностей образца при длине волны 610 нм и 280 нм. После внесения проб в лунки пластины инкубировали 48 ч. По истечении срока инкубации пластины геля высушивали и окрашивали раствором амидочерного 10Б. Диаметр колец преципитации измеряли с помощью линейки. Строили калибровочный график по результатам определения контрольных проб ЦП. Исходя из калибровочного графика, рассчитывали концентрацию ЦП в опытных пробах.

Антисыворотку к ЦП получали при иммунизации лабораторных кроликов породы шиншилла, обоего пола, массой 2,5 – 3 кг. Животных иммунизировали 5-кратно с интервалом 7 – 10 дней: при первых четырех инъекциях антиген (раствор церулоплазмина) вводили внутрикожно, при пятой инъекции — внутривенно. Для иммунизации использовали препараты ЦП со степенью очистки не менее 0,045. Доза на одного животного составляла 1 мг белка на одну инъекцию. Антиген вводили в несколько точек, предварительно смешав с равным объемом адьюванта Фрейнда; на 5-м этапе иммунизации раствор ЦП вводили в ушную вену. Через 6 – 7 дней после окончания цикла иммунизации производили пробное взятие крови. После свертывания крови отделяли сыворотку. Сыворотки тестировали на специфичность методом иммуноэлектрофореза по Грабару [7], используя в качестве антигена стандартную сыворотку крови человека (производство "ИмБио", Н. Новгород). Отбирали образцы сыворотки, образующие одну дугу преципитации. В отобранных сыворотках определяли титр специфических антител методом Ухтерлони [1], используя в качестве антигена раствор очищенного церулоплазмина. Отбирали сыворотки с титром антител не ниже 1:4, объединенный пул сывороток использовали в дальнейших экспериментах.



Изменение оксидазной активности плазмы и концентрации экзогенного церулоплазмина при внутривенном (а) и внутримышечном (б) введении препарата.

По осям ординат — значения оксидазной активности плазмы, выраженные в ед/мл, и концентрация иммунореактивного церулоплазмина, выраженная в мкг/мл плазмы; по осям абсцисс — время после введения препарата. 1 — оксидазная активность плазмы; 2 — концентрация церулоплазмина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования представлены на рисунке. Отмечается отсутствие корреляции между количеством введенного ЦП и ферментативной активностью плазмы. Немедленно после введения ЦП внутривенно оксидазная активность плазмы увеличивалась, но уже через 4 ч после инъекции наблюдалось ее резкое снижение. В то же время концентрация экзогенного ЦП в плазме не менялась в течение 4 ч. Активность плазмы не зависела от присутствия экзогенного ЦП, оставаясь повышенной по сравнению с исходным уровнем даже тогда, когда ЦП человека в ней переставал обнаруживаться, в особенности при внутримышечном введении препарата. Экзогенный ЦП переставал обнаруживаться в плазме спустя 4 дня после внутримышечного и через 6 дней после внутривенного введения. Таким образом, наблюдается регуляция ферментативной активности ЦП. По-видимому, существует оптимальный физиологический уровень этого параметра, превышение которого является потенциально вредным для организма. Это подтверждается данными о прооксидантном эффекте ЦП [9] и о его участии в патогенезе сер-

дечно-сосудистых заболеваний [10]. Поскольку у большинства животных наблюдалось увеличение ферментативной активности плазмы даже в отсутствие иммунореактивного ЦП, возможно, что экзогенный препарат стимулирует выработку эндогенного фермента. Таким образом, лечебный эффект препарата вряд ли зависит от его ферментативной активности. Поскольку именно этот параметр является критерием оценки качества препарата при его производстве, необходимо пересмотреть существующие требования к свойствам данного лекарственного средства.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что при внутримышечном введении уже через сутки в периферическую кровь поступает значительное количество ЦП, причем удается достичь такого же уровня ферментативной активности плазмы, как и при внутривенном введении. Это свидетельствует о том, что внутривенное введение, препарата церулоплазмин, не является единственно приемлемым способом. Внутримышечное введение также позволяет быстро достичь эффективных концентраций препарата в периферической крови. Эта процедура не требует стационарных условий и данный способ введения препарата позволит расширить область его клинического применения.

ВЫВОДЫ

1. Ферментативная активность церулоплазмина не является критерием оценки его концентрации в плазме

и не всегда коррелирует с количеством экзогенно введенного церулоплазмина.

2. Внутримышечное введение препарата является допустимым способом применения данного лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. Бем, *Иммунологические методы*, Мир, Москва, (1979), 31 – 37.
2. Э. Бем, *Иммунологические методы*, Мир, Москва, (1979), 49 – 52.
3. Т. А. Крайнова, Л. М. Ефремова, *Церулоплазмин — биологические свойства и клиническое применение*, Изд. НГМА, Н. Новгород, (2000).
4. Т. А. Крайнова, Л. М. Ефремова, Ю. К. Пискарева и др., *Вестн. службы крови России*, № 2, 38 – 41 (2002).
5. Т. А. Крайнова, Л. М. Ефремова, И. В. Мухина, В. В. Анастасиев, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 3, 62 – 65 (2003).
6. О. Л. Санина, Н. К. Бердинских, *Вопр. мед. хим.*, № 5, 7 – 14 (1986).
7. Х. Фримель, *Иммунологические методы*, Мир, Москва, (1979), 9 – 18.
8. P. Arnaud, E. Gianazza, and L. Miribel, *Meth. Enzymol.*, **163**, 441 – 452 (1988).
9. E. Ehrenwald, G. M. Chisholm, and P. L. Fox, *J. Clin. Invest.*, **93**, 1493 – 1501 (1994).
10. P. L. Fox, B. Mazumder, E. Ehrenwald, and C. K. Mukhopadhyay, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1735 – 1744 (2000).

Поступила 12.01.03

DYNAMICS OF OXIDASE ACTIVITY IN BLOOD PLASMA UPON INTRAVENOUS AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION OF CERULOPLASMIN

T. A. Krainova, L. M. Efremova, K. A. Sherer, O. V. Milovidova, Yu. K. Naumova, and V. V. Anastasiev

“Microgen” State Research and Production Corporation, “ImBio” State Enterprise of Bacterial Preparations, ul. Gruzinskaya 44, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

Oxidase activity dynamics in the blood plasma of test animals was studied upon intravenous and intramuscular injections of ceruloplasmin. It was found that the enzymatic activity does not reflect the content of drug in the blood plasma and is not always correlated with the amount of exogenously introduced drug. Intramuscular injections can also be used for the administration of ceruloplasmin.