

Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, А.Г. Горохов, А.А. Рунович

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ

НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

Статья посвящена разработке экспрессного метода оценки функциональной активности монооксигеназной системы печени с использованием тонкослойной хроматографии для определения содержания антипирина в слюне. Достоинством предлагаемого метода является простота пробоподготовки анализируемого образца, экономичность, экспрессность и надежность. Он может быть использован для оценки детоксицирующей функции печени в клинической и поликлинической практике.

Ключевые слова: печень, ферменты

DETERMINATION OF ACTIVITY OF FERMENTS OF MONOOXYGENASE SYSTEM OF LIVER

E.E. Kuznetsova, V.G. Gorokhova, A.G. Gorokhov, A.A. Runovich

SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk

The article is devoted to working out of express method of evaluation of functional activity of monooxygenase system of liver with the use of thin-layer chromatography for determination of antipyrin content in saliva. The advantage of described method is simplicity of test sample preparation, economy, quickness and reliability. The method may be used for evaluation of detoxicating function of liver in clinics and out-patient departments.

Key words: liver, enzyme

Монооксигеназная ферментная система (МОС), локализованная в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, выполняет ряд важных функций, направленных на поддержание гомеостаза. С участием МОС осуществляется метаболизм ряда эндогенных соединений (холестерина, желчных кислот, стероидных гормонов, тироксина, билирубина, ненасыщенных жирных кислот и других). Помимо этого, окисляя чужеродные соединения (лекарственные препараты, пестициды, гербициды, пищевые консерванты и др.) и превращая их в менее липофильные и легковыводимые из организма, биотрансформационная система печени осуществляет важнейшую защитную функцию организма [1, 3].

Существует ряд прямых и косвенных методов определения активности монооксигеназной системы. Поскольку цитохром Р-450 прочно связан с мембранами цитоплазматической сети, прямые методы предусматривают определение непосредственно в образцах ткани печени содержания гемопротейда и его каталитической активности *in vitro* по отношению к различным субстратам. Наиболее доступными и приемлемыми являются непрямые методы, основанные на исследовании фармакокинетики ряда модельных препаратов (антипирин, амидопирин, теофиллин, фенобарбитал и др.) [4].

Из всех перечисленных способов оценки активности ферментов МОС печени общее признание среди клиницистов и фармакологов приобрел антипириновый тест.

Основанием для использования антипирина (АП) в качестве индикатора активности МОС яв-

ляются: высокая биодоступность (97 – 100 %), равномерное распределение этого соединения и его метаболитов в органах, тканях и жидких средах, полное превращение в печени, незначительная элиминация почками в неизменном виде, низкая токсичность [4].

Антипириновый тест не зависит от кровотока и может быть использован при исследовании функции МОС у больных с нарушенной печеночной циркуляцией крови [9]. АП почти не экскретируется с желчью, что позволяет применять этот тест при холестатических заболеваниях печени. На показатели АП теста не оказывает влияния и поражение почек [4].

Незначительное связывание антипирина с белками плазмы и тканей обуславливает близкие значения объема распределения препарата и его фармакокинетические параметры элиминации при измерениях, производимых в различных биологических жидкостях — слюне и крови [3]. Поэтому в последние годы стали использовать слюну, т.к. эта процедура проста, удобна, безболезненна, отсутствует риск внесения инфекции.

Антипириновый тест основан на определении содержания АП в биологической жидкости в разные промежутки времени после его перорального применения в дозе 20 мг/кг с последующим расчетом периода полувыведения и клиренса препарата.

Для определения концентрации антипирина в биологических средах предложен ряд методов: спектрофотометрический, фотоколориметрический [6], газожидкостной, высокоэффективной жидкостной [2, 5] и тонкослойной хроматографии.

Нами разработана упрощенная и экспрессная методика количественного определения антипирина в слюне с использованием тонкослойной хроматографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура: анализ АП — на пластинках марки «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В. Реактивы: в работе использовали субстанцию АП, отвечающую требованиям НТД, уксусную кислоту (х.ч.), фосфорную кислоту (х.ч.), реактив Эрлиха (х.ч.), дистиллированную воду. Условия хроматографирования: состав подвижной фазы — уксусная кислота : вода (3:1).

Исследуемый образец слюны центрифугирует при 3000 об./мин в течение 10 мин. Полученный супернатант наносят вместе со стандартными растворами антипирина на хроматографическую пластину. В течение 2 — 3 мин выдерживают при t 50 °С. Обрабатывают реагентом, содержащим реактив Эрлиха — ароматический альдегид в смеси уксусной и фосфорной кислот. Повторно выдерживают пластину при t 50 °С в течение 2 — 3 мин. Антипирин проявляется на пластинах в виде четких окрашенных розовых пятен.

Содержание антипирина рассчитывают по площадям пятен пробы и стандарта. Время анализа составляет не более 30 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перечисленные выше методы определения антипирина многостадийны и длительны по времени. Существенным недостатком спектрографического и фотоколориметрического определения антипирина является необходимость химической модификации препарата при подготовке образца к анализу, зависимость интенсивности окраски анализируемого раствора от времени и температуры. Кроме того, данные способы не достаточно чувствительны и требуют больших затрат времени на выполнение. При газожидкостном хроматографировании дополнительным отягчающим фактором служит использование высокой температуры. Все это приводит к нарушению воспроизводимости результатов и снижению точности количественного определения антипирина. Длительность анализа 1 — 1,5 часа.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии антипирина в слюне [2] требует использования дорогостоящего оборудования и реактивов. В работе [7] предлагается способ определения антипирина методом тонкослойной хроматографии. К недостаткам данного способа следует отнести многостадийность, использование летучих реагентов раздражающего действия — йод, ледяная уксусная кислота и длительность анализа (в пределах часа). Кроме этого, увлажнение хроматографической пластины после проявления в порах йода приводит к размыванию и нечеткой выраженности пятен на пластине, что сказывается на точности и чувствительность анализа.

Предлагаемый нами способ определения антипирина в слюне методом тонкослойной хроматографии лишен вышеперечисленных недостатков и закреплен патентом России [8].

Использование пластины марки «Сорбфил» дает возможность эффективно разделять анализируемые вещества — антипирин и его метаболиты, ускорить процесс хроматографирования и снизить стоимость анализа. Применение для элюирования дистиллированной воды, модифицированной концентрированной уксусной кислоты, упрощает способ, сокращает время проведения анализа и делает его более экономичным. Проявления антипирина реагентом, представляющим собой реактив Эрлиха, растворенный в смеси уксусной и фосфорной кислот, позволяет получить устойчивое окрашивание пятен исследуемых веществ, которое не изменяется при длительном хранении. Все это позволяет увеличить чувствительность анализа и воспроизводимость результатов.

Разработанная методика была использована для изучения фармакокинетики антипирина в слюне после его однократного приема в дозе 20 мг/кг и забора слюны через 24 часа. Всего было исследовано 25 доноров, 40 больных коронарным атеросклерозом, 10 пациентов с железодефицитной анемией, 8 — с миелоидным лейкозом, 10 — с хроническим гепатитом. Исследования проводились при поступлении в клинику и в процессе лечения.

Динамика изменения антипиринового теста представлена в табл. 1. Фармакокинетические па-

Таблица 1

Динамика фармакокинетических параметров антипирина

Группы больных	При поступлении		В процессе лечения	
	Cl _{ir} (мл/мин)	T ½ час	Cl _{ir} (мл/мин)	T ½ час
ИБС	40,5 ± 0,6*	12,61 ± 0,7*	40,4 ± 0,6**	9,0 ± 0,4
Железодефицитная анемия	42,48 ± 1,2*	10,32 ± 0,6*	50,14 ± 0,9**	9,0 ± 0,5
Миелоидный лейкоз	42,0 ± 1,1*	10,9 ± 0,5*	46,32 ± 1,1	9,2 ± 0,6
Хронический гепатит	39,74 ± 0,9*	11,09 ± 0,3*	50,8 ± 1,3**	8,9 ± 0,7
Практически здоровые	52,5 ± 0,8	8,48 ± 0,3		

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем, ** — различия достоверны по сравнению с исходными данными.

раметры АП в исходном состоянии больных достоверно отличались от показателей практически здоровых людей. Наиболее выражены эти изменения у пациентов с хроническим гепатитом и ишемической болезнью сердца (ИБС), что указывает на нарушение функционирования микросомальной системы гидроксилирования в гепатоцитах. В процессе проведения лечения антипириновый тест выявил позитивные сдвиги в состоянии МОС у всех групп больных, однако наиболее существенными они были у пациентов с коронарным атеросклерозом и хроническим гепатитом.

Таким образом, разработанная методика экономична, экспрессна, надежна и удобна. Не требует использования дорогостоящего оборудования и растворителей. В настоящее время она нашла широкое применение в практике Областной клинической больницы, Городской детской клинической больницы с целью диагностики заболеваний печени и оценки эффективности проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление / А.И. Арчаков. — М.: Наука, 1975. — 327 с.
2. Высокоэффективная жидкостная хроматография антипирина — метод экспресс-диагностики функциональной активности монооксигеназной системы печени человека / Т.В. Андреева, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, А.Г. Горохов // Хим-фарм. журн. — 2001. — № 1. — С. 10—11.
3. Заводник Л.Б. Оценка монооксигеназной функции печени по кинетике антипирина и его метаболитов в жидких средах организма / Л.Б. Заводник, П.И. Лукиенко, М.И. Бушма // Фарм. и токсикол. — 1989. — Т. 52, № 3. — С. 95—101.
4. Горштейн Э.С. Антипириновый тест и его использование в клинике // Э.С. Горштейн, А.В. Семенюк, А.Я. Майоре. Успехи гепатологии. Рига, 1988. — Вып. 14. — С. 128—147.
5. Количественное определение антипирина и его метаболитов в моче методом микроколоночной ВЭЖК / И.А. Рахманов, А.В. Семенюк, Н.М. Слынько и др. // Хим-фарм. журн. — 1989. — № 3. — С. 351—354.
6. Коренман И.М. Фотометрический анализ: Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. — М., 1970. — 180 с.
7. Новый метод оценки функционального состояния печени в клинике внутренних болезней и при диспансеризации некоторых контингентов населения: Метод, рекомендации. — М., 1990. — 25 с.
8. Патент РФ 2228527 (2004); БИ 2004. — № 13.