

УДК 577.355

ПРИМЕНЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.Э. Кондаков, М.Я. Мельников, П.Н. Козаченко*, Е.В. Блынская**,
К.В. Алексеев**

(кафедра химической кинетики; e-mail: melnikov46@mail.ru)

Рассмотрена принципиальная возможность использования показателя оседания клеток крови в качестве неспецифического биосенсора для изучения изменения активности разных партий одного фармацевтического препарата.

Ключевые слова: фармацевтическая активность, кровь, седиментация, неспецифический биосенсор.

В работе [1] мы предложили модель поведения клеток крови при оседании, учитывающую разные типы межклеточных взаимодействий. В [2] авторы показали, что оседание эритроцитов – многостадийный процесс, зависящий не только от физико-химических свойств системы, но и от сохранения метаболической активности форменных элементов крови, в частности нейтрофилов. Установлено, что добавление в оседающую кровь микроколичеств веществ, не меняющих физико-химические свойства системы, но специфически влияющих на метаболизм белых клеток крови, значительно замедляет оседание всей клеточной массы [3].

Динамика оседания форменных элементов крови при приеме лекарственных препаратов человеком, как было показано ранее [4], аналогична наблюдаемой при добавлении того же препарата к образцу крови данного человека вне организма. Следовательно, при изучении процесса седиментации клеток крови с добавкой исследуемого препарата *in vitro* открывается возможность прогнозировать его воздействие *in vivo*. Иными словами, зная, как конкретное вещество воздействует на процесс оседания форменных элементов крови, можно использовать эффективность воздействия как величину отклика биосенсора, в качестве которого выступают клетки крови. Таким образом, наблюдая за процессом оседания клеток крови (неспецифического биосенсора), можно попытаться проводить сравнительные исследования активности фармацевтических препаратов (например какого-либо одного препарата из разных серий, выпускаемых одним или разными производителями).

Цель настоящей работы – экспериментальное изучение возможности использования форменных элементов крови в процессе их оседания в качестве неспецифических биосенсоров.

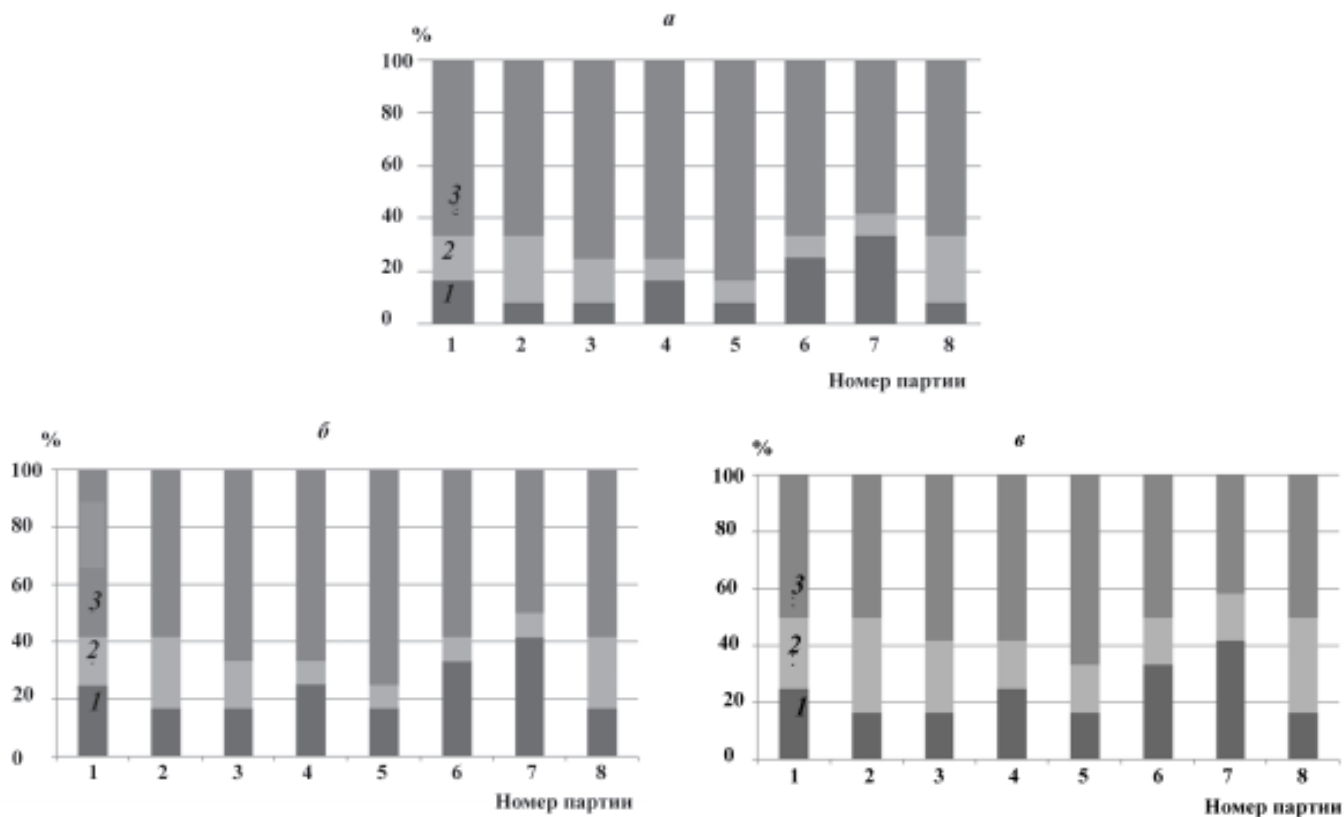
Методика эксперимента

В качестве величины, характеризующей воздействие препарата на систему, мы взяли абсолютную разность между величинами столбика плазмы над оседающей клеточной массой с добавкой исследуемого вещества и без него.

При измерении скорости оседания клеток крови (показатель СОЭ) стабилизированную антикоагулянтом (цитратом натрия) кровь набирали в стандартный капилляр так, чтобы высота столбика крови составляла 100 мм. Внутренний диаметр капилляра составлял $1 \pm 0,1$ мм. Капилляр устанавливали в вертикальное положение и через определенное время (в нашем случае 60 мин) определяли величину высоты столбика плазмы над оседающей красной кровью.

Для проведения эксперимента мы выбрали препарат ампициллин (фармацевтическая группа антибиотиков, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения, 250 мг) [5]. Образцы препарата взяли из разных партий. Модифицированную методику для определения пищевой аллергии [6] использовали следующим образом. Приобретенные лекарственные формы (8 образцов) растворяли в физиологическом растворе в соответствии с прилагаемой инструкцией. Полученный маточный раствор фильтровали через бактериальный фильтр и 10 мкл фильтрата добавляли к 10 мл исходного фи-

*Кафедра химии ЮРГУЭС, г. Ростов; **ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва.



Диаграммы изменения суммарных реакций (1 – сильная реакция, 2 – возможная реакция, 3 – нет реакции по сравнению с контролем) одинаковых образцов крови на один и тот же препарат из разных партий, фиксируемых через разные промежутки времени (мин): *a* – 30, *б* – 60, *в* – 90)

физиологического раствора. Таким образом, была создана модель концентрации фармацевтического препарата в кровеносном русле при его внутривенном введении из расчета на 5 л крови. Полученные образцы препарата по 10 мкл вносили в круглодонную иммунологическую плашку размером 8×12 лунок (8 лунок в столбце и 12 лунок в ряду) так, чтобы было заполнено все поле. На отдельную иммунологическую плашку в 12 лунок вносили исходный физиологический раствор, используемый в качестве контроля. Была приготовлена матрица на 12 образцов крови, добавленной в 8 лунок с образцами одного препарата из разных партий. 12 образцов донорской крови вносили в соответствующий столбец предварительно подготовленной плашки с ампициллином и физиологическим раствором без ампициллина. Полученные плашки инкубировали в течение 20 мин в иммуношейкере при постоянном перемешивании при температуре 28°C. По окончании инкубации полученные опытные и контрольные смеси набирали в стандартные капилляры для измерения СОЭ. Скорость оседания в опытном и контрольном вариантах фиксировали при 30, 60, 90 мин и больших временах.

Результаты и их обсуждение

В качестве критерия активности использовали изменение показателя СОЭ за 1 ч в образце крови, содержащей аликвоту препарата, по сравнению с показателем СОЭ крови без добавки. Рассчитывали среднюю скорость оседания: для каждого конкретного времени и каждого образца крови конкретного донора вычисляли отклонение от среднего. Отличие более чем на 2 мм в ту или иную сторону фиксировалось как сильная реакция, отличие на 1 мм – как возможная реакция. Для обработки результатов подсчитывали число соответствующих реакций для каждого образца препарата. Полученные данные представлены на рисунке в виде процентной диаграммы. Из приведенных данных видно, что наиболее четкая сильная реакция проявляется при времени оседания 60 мин. При времени оседания 30 мин число прореагировавших образцов было меньше, чем при 60 мин, а при больших временах наблюдения число прореагировавших образцов остается приблизительно одинаковым, но реакция из сильно выраженной превращается в слабую, однако общая картина остается практически неизменной.

Для контроля аналогичные исследования были проведены при использовании только одного образца препарата. Полученная картина во всех 8 случаях практически совпадает.

Таким образом, было показано, что активность препарата в разных партиях неодинакова. Причиной этого часто наблюдаемого эффекта может быть нестабильность работы штамма продуцента антибиоти-

ка. Все вышесказанное свидетельствует о необходимости и возможности создать методы индивидуального подбора лекарственных препаратов (индивидуальной фармации). Кроме того, предлагаемый подход может быть использован в качестве одного из экспериментальных методов исследования биоэквивалентности, например, при изменении агрегатного состояния вещества без изменения его химического состава.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондаков С.Э., Мельников М.Я., Токарев А.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. **49**. С. 238.
2. Kindzelskii A.L., Zhou M.-J., Haugland R.P., Boxer L.A., Petty H.A. // Biophys. J. 1998. **74**. P. 90.
3. Воейков В.Л., Гурфинкель Ю.И., Дмитриев А.Ю., Кондаков С.Э. // Докл. РАН. 1998. **359**. С. 686.
4. Gurfinkel Yu., Bouravleva E., Voeikov V. // Biorheology. 2002. **39**. P. 675.
5. Ампициллин-Ферейн // ФСЦП 42-0053-6128-05. Брынцалов-А ЗАО (РФ).
6. Баранчиков В.И., Воейков В.Л., Волков А.В., Кийко Ю.И., Кондаков С.Э., Новиков К.Н., Розенталь В.М. // Патент РФ № 2152616 от 06.10.2000.

Поступила в редакцию 09.10.08

APPLICATION OF THE BLOOD SEDIMENTATION PROCESSES AS A NONSPECIFIC BIOSENSORS ON THE BASIS OF ACTIVE COLLOIDAL SYSTEMS MODEL FOR THE MONITORING OF PHARMACEUTICAL ACTIVITY OF SUBSTANCES

S.E. Kondakov, M.Ya. Mel'nikov, P.N. Kozatzenko, E.V. Blynskaya, K.V. Alekseev
(Division of Chemical Kinetic)

The application of blood cell sedimentation for the monitoring of the pharmaceutical activity was shown.

Key words: *pharmaceutical activity, blood, sedimentation, nonspecific biosensor.*

Сведения об авторах: Кондаков Сергей Эмильевич – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (495)9391814; Мельников Михаил Яковлевич – глав. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (melnikov46@mail.ru); Козаченко Петр Николаевич – зав. кафедрой химии ЮРГУЭС (г. Ростов), докт. хим. наук, профессор; Бlynская Евгения Викторовна – аспирант ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН; Алексеев Константин Викторович – зав. лабораторией ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. фарм. наук.