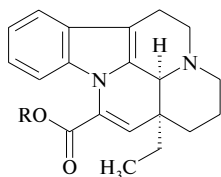


А. А. Буркин¹, М. А. Буркин²

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ. СООБЩЕНИЕ 1. ВИНПОЦЕТИН И АПОВИНКАМИНОВАЯ КИСЛОТА

¹ Государственный НИИ органической химии и технологии, Москва;² НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова РАМН, Москва

Винпоцетин (кавинтон, этиловый эфир аповинкаминовой кислоты) является полусинтетическим производным алкалоида девинкана, расширяющим сосуды мозга, усиливающим кровоток, и потому считается эффективным в остром периоде инсульта и иных нарушениях, связанных с расстройствами мозгового кровообращения.

Винпоцетин $R = C_2H_5$ Аповинкаминовая кислота $R = H$

Под влиянием неспецифических эстераз винпоцетин (ВЦ) превращается в аповинкаминовую кислоту (АВК). Как было установлено в экспериментах с меченым тритием ВЦ, АВК могла быть выделена из крови и мочи и идентифицирована с помощью масс-спектрометрии и инфракрасной спектроскопии [1].

Для изучения фармакокинетики ВЦ и АВК у человека и слежения за уровнем терапевтических концентраций необходимо использование высокочувствитель-

ных и специфичных методов анализа этих веществ в биологических образцах. С этой целью в 1982 г. при анализе АВК в моче и плазме крови человека была предложена ион-парная экстракция в хлороформ с последующей ВЭЖХ на обращено-фазовом сорбенте с УФ-детектором, что обеспечивало определение АВК с чувствительностью 20 нг/мл [2]. Для повышения чувствительности на порядок были использованы капиллярная ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором и еще более сложная пробоподготовка — метилирование сухого экстракта диазометаном, очистка препарата от примесей отмыжкой подкисленного раствора эфиром и затем извлечение метилового эфира АВК из защелоченного до pH 11 раствора снова в серный эфир [3]. Разработка подобных приемов хроматографического анализа осложнялась эффектом переэтерификации вещества, происходящей под действием органических растворителей [4], и только в 1997 году был предложен подход, основанный на твердофазной экстракции и последующей ГХ/МС, обеспечивающий необходимую точность и воспроизводимость [5]. Применение таких методов позволило решить целый ряд задач по исследованию биотрансформации ВЦ.

О получении антител к ВЦ и развитии на их основе специфического метода иммуноферментного определения этого вещества в плазме человека было сообщено в 1992 г. [6]. Метод обладал необходимой чувствительностью, но не позволял определять основной метаболит и требовал стадии экстракции.

Настоящая работа посвящена созданию альтернативного описанному выше метода определения ВЦ и АВК на основе непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), использующего в качестве пробоподготовки простое разведение анализируемого образца и способного выявлять продукты метаболизации ВЦ, сохраняющие тот же характер фармакологического действия.

Материалы и методы

УФ-спектры снимали на приборе “Hitachi-557” (Япония). ИФА выполняли на микропланшетах “Costar” (США) и “Dynatech” (Германия) и фотометрах “АКИ-Ц-01” (Россия) и “Dynatech MR5000” (Германия).

Конъюгирование АВК с бычьим (БСА), кроличьим (КСА) сывороточными альбуминами и желатиной (Жел) осуществляли с 25-кратным мольным избытком гаптена по отношению к белковому носителю методом активированных эфиров. Для этого эквиволярные ко-

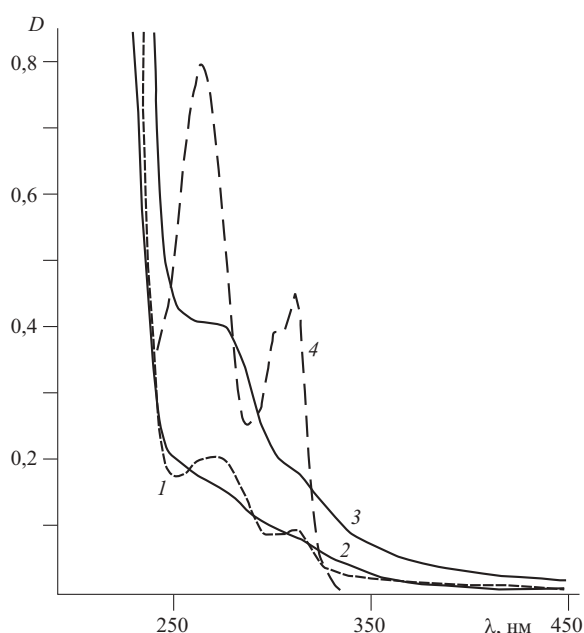


Рис. 1. УФ-спектры конъюгатов АВК с белками, 0,1 мг/мл, H₂O: 1. КСА-АВК, 2. Жел-АВК, 3. БСА-АВК, 4. АВК, 20 мкг/мл, H₂O

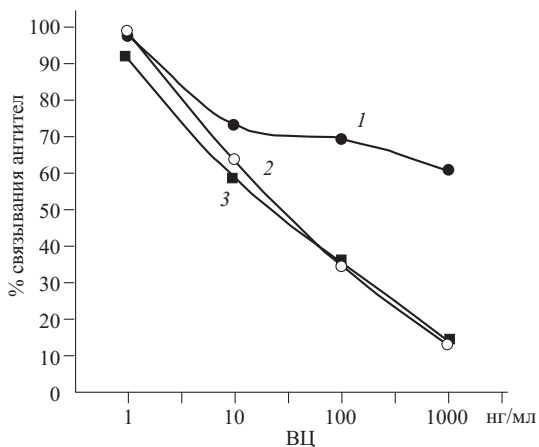


Рис. 2. Калибровочные кривые иммуноферментного определения ВЦ при использовании твердофазных БСА-АВК (1), КСА-АВК (2), Жел-АВК (3)

личества АВК, N-гидроксисукцинимид и карбодиимида растворяли в диметилформамиде и перемешивали при комнатной температуре. Затем этот раствор в соответствующей пропорции добавляли к растворам белков в 1,5 мл 0,05М карбонатного буфера pH 9,5 каждый. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при комнатной температуре, после чего помещали в диализные мешки и диализовали против 3 смен 1000-кратного объема 0,5 % раствора хлористого натрия. Полученные конъюгированные антигены в концентрации 1 мг/мл (по белку) сохраняли в 50 % глицерине при минус 10 – 15° С.

Конъюгат БСА-АВК использовали для иммунизации кроликов-самцов темной масти массой 2,5 – 3 кг. Инъекции выполняли подкожно в 10 – 15 точек области спины. Для первого введения 100 мкг иммуногена эмульгировали в полном адьюванте Фрейнда, повторные, также по 100 мкг, осуществляли водными растворами. Через 7 дней после каждой повторной инъекции у животных из краевой вены уха отбирали кровь, отделяли сыворотку, добавляли равный объем глицерина и хранили до использования при минус 10 – 15° С.

Каждую порцию сыворотки тестировали отдельно на связывание со всеми синтезированными конъюгатами, сорбированными на твердой фазе полистироловых планшетов. Для этого ячейки заполняли 0,2 мл растворов конъюгатов в концентрации 0,05 мкг/мл в 0,05М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,5 и инкубировали 16 ч при 4° С. Затем планшеты отмывали 4 – 5 раз 0,15М хлористым натрием, содержащим 0,05 % твина-20 и в ячейки вносили по 0,2 мл сыворотки в разведении от 1:400 до 1:10000 в фосфатно-солевом буфере pH 7,5, содержащем твин-20 и 1 % БСА (ФСБ-т). Через 1 ч инкубации ячейки планшетов вновь отмывали и заполняли 0,2 мл раствора конъюгата антивидовых антител с пероксидазой хрена. После часовой инкубации и отмывки в ячейки помещали по 0,2 мл субстратного раствора, содержащего 4 мг *o*-фенилендиамина и 1 мкл 30 % перекиси водорода в 10 мл 0,15М цитрат-фосфатного буфера pH 5,0. Через

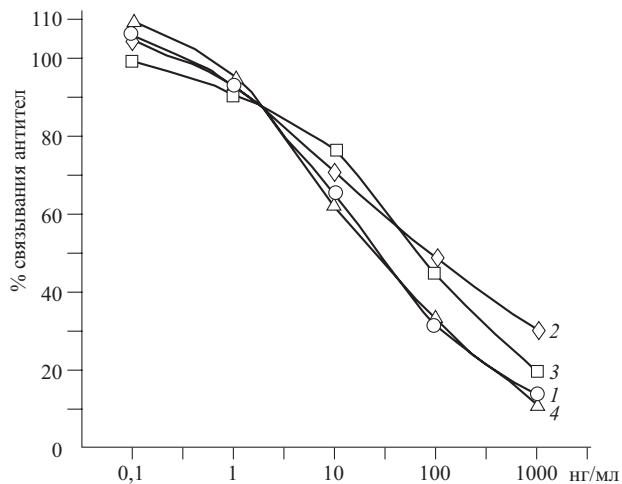


Рис. 3. Перекрестная реактивность структурных аналогов АВК в ИФА: 1 – ВЦ, 2 – АВК, 3 – этилвинкаминат, 4 – метилаповинкаминат

45 мин останавливали ферментативную реакцию добавлением 50 мкл 4М серной кислоты и проводили фотометрию при 492 нм. Концентрации антисывороток, обеспечивающие оптическую плотность от 0,8 до 1,2, считали рабочим титром и использовали в конкурентных исследованиях, для чего в ячейки-дубли добавляли 0,1 мл исследуемых веществ или анализируемых образцов, разведенных в 10 раз в ФСБ-т и затем по 0,1 мл антисыворотки в двойном титре.

Перекрестную реактивность рассчитывали как отношение концентрации раствора ВЦ, приводящей к 50 %-ному торможению связывания антител с твердой фазой, к соответствующей концентрации испытуемого вещества, выраженное в процентах.

В работе использовали винпоцетин, аповинкаминую кислоту, метилаповинкаминат и этилвинкаминат, N-гидроксисукцинимид, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида, пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7.) “Sigma” (США), альбумины, желатин и антисыворотку осла к иммуноглобулинам кролика отечественного производства. Антивидовой пероксидазный конъюгат получали по методу [7].

Результаты и их обсуждение

Факт образования конъюгированных антигенов во всех случаях был подтвержден спектрофотометрически (рис. 1), на котором видно, что в спектрах каждого из полученных конъюгатов в той или иной мере представлены пики поглощения в ультрафиолетовой области с максимумами около 310 и 260 нм, свойственные гаптену.

Выбор БСА-АВК в качестве иммуногена, схемы применения и его дозирование явились, по-видимому, оптимальными — титры антител в сыворотках, полученных от первого до четвертого взятия крови, а также параметры конкурентного ИФА оказались весьма близкими. При этом пропорциональный характер зависимости “процент связывания антител — концент-

Метрологические параметры ИФА ВЦ ($n = 9$)

Параметр	Концентрация, нг/мл					
	1000	100	10	1	0,1	0
Среднее значение оптической плотности	0,117	0,249	0,488	0,69	0,786	0,743
Среднее значение % связывания антител	13	32	65	93	106	100
Стандартное отклонение	0,00866	0,01616	0,03114	0,04873	0,06065	0,05376
Коэффициент вариации, %	7,4	6,4	6,4	7,1	7,7	7,2

рация ингибитора” соблюдался для твердофазных конъюгатов КСА-АВК и Жел-АВК, а при использовании на твердой фазе иммуногена БСА-АВК имело место высокодозовое плато (рис. 2). Следует отметить, что в своей практике создания ИФА низкомолекулярных физиологически активных веществ мы имеем пока лишь один пример удачного применения иммуногена в качестве иммобилизованного антигена [8]. Как правило, для этих целей используются иные макромолекулярные носители для предотвращения возможного связывания с твердой фазой, обусловленного взаимодействием не с гаптенной детерминантой, а с модифицированным в ходе конъюгирования носителем.

Оценка перекрестной реактивности антител с различными структурными аналогами ВЦ и его основного метаболита АВК была выполнена на сыворотке, полученной после трех инъекций иммуногена (рис. 3). Результаты проведенного исследования указывали на групповой характер распознавания этих веществ. Так, в ряду ВЦ, АВК, этилвинкаминат, метилаповинкаминат перекрестная реактивность составила 100, 31, 41,5 и 104,4 %, соответственно, что делает возможным использование одного аналитического инструмента для выявления близких по структуре веществ со сходной физиологической активностью.

Для выяснения возможности использования ИФА ВЦ и АВК при исследовании различных биологических жидкостей были проведены модельные эксперименты с внесением ВЦ в плазму, сыворотку и мочу человека. Установлено, что калибровочные кривые им-

муноферментного определения вещества были близки по своим параметрам, полученным ранее для ФСБ-т, а имевшиеся незначительные различия не превышали допустимых пределов варируемости для этого метода (таблица).

Таким образом, в настоящей работе продемонстрирована возможность получения поликлональных кроличьих антител к конъюгированному антигену БСА-АВК и создание на их основе ИФА ВЦ и АВК с чувствительностью 1 нг/мл при определении в ФСБ-т, моче, плазме, сыворотке человека (без использования приема концентрирования анализируемого образца). Установлен групповой характер перекрестной реактивности антител для близких структурных аналогов АВК.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Czira, L. Vereczkey, J. Tamas, et al., *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry a. Medicine*, Vol. 1, A. Frigerio (ed.), N. Y. (1978), p. 143.
2. M. Kozma, P. Pudleiner, and L. Vereczkey, *J. Chromatogr.*, **241**(1), 177 – 182 (1982).
3. M. Poglár and L. Vereczkey, *J. Chromatogr.*, **241**(1), 29 – 32 (1982).
4. A. Lohmann and E. Dingler, *J. Chromatogr.*, **529**(2), 442 – 448 (1990).
5. M. Vatsova, S. Tzvetanov, A. Drenska, et al., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **702**(1 – 2), 221 – 226 (1997).
6. B. Reck, E. Dingler, and A. Lohmann, *Arzneimittelforschung*, **42**(10), 1171 – 1174 (1992).
7. P. K. Nakane and A. Kawaoi, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**(2), 1084 – 1091 (1974).
8. А. А. Буркин, Г. П. Кононенко, В. Г. Зорян, Н. А. Соболева, *Прикладная биохимия и микробиология*, **36**(4), 428 – 432 (2000).

Поступила 23.07.02