

ФАРМАКОКИНЕТИКА

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ГЛИПРОЛИНА — PGP — ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ

З. В. Бакаева¹, Г. Е. Самонина¹, Л. А. Андреева², Ю. А. Золотарев²,
В. С. Козик², И. П. Ашмарин¹, Н. Ф. Мясоедов²

Исследовали содержание меченного тритием PGP в плазме (без белков) и белках плазмы крови, в органах (в течение 5 ч) и в моче (в течение 8 ч) крыс после внутрижелудочного введения. Наибольшая радиоактивность в плазме крови крыс наблюдалась через 15 мин после введения [³H] PGP: она составила почти 1,7 % от введенной радиоактивности. В последующем происходит постепенное снижение, но даже и через 5 ч она составляла около 0,8 %. Радиоактивность осажденных белков плазмы наоборот, со временем возрастает. Значительно меньшее процентное содержание PGP и его метаболитов выявлено в исследуемых органах. Через 15 мин радиоактивность кишечника была 1,4 %, желудка 0,1 %, печени 0,09 %, мозга, сердца и почек — менее 0,05 %; через 5 ч во всех органах (кроме кишечника > 0,1 %) было выявлено менее 0,02 %. PGP и его метаболиты в моче не обнаружены; не исключено участие глипролинов, введенных в составе PGP в синтезе новых пептидов и белков, в том числе и коллагена.

Ключевые слова: [³H] PGP, глипролины - PGP, PG, GP, уровень радиоактивности

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время выявлено новое семейство регуляторных пептидов (РП), состоящих из пролина (или оксипролина) и глицина — глипролины [1, 2]. Источником этих пептидов могут быть как эндогенные белки — коллаген и эластин, так и ряд пищевых белков. Глипролины обладают сходной биоактивностью: они могут тормозить свертываемость крови и оказывать антитромботическое действие, а также оказывать протекторный противоязвенный эффект, повышая устойчивость слизистой оболочки желудка животных к действию различных ulcerогенных факторов [10, 11]. Помимо этого, выявлена их способность ускорять заживление уже развившейся язвы желудка, т.е. оказывать лечебное действие [4]. К настоящему времени имеются предпосылки для использования глипролинов и прежде всего трипептида PGP в качестве противоязвенного и антитромботического препарата.

Считается общепринятым, что регуляторные пептиды относительно неустойчивы в организме и время полураспада их не превышает 1 – 2 ч. Кроме того, до последнего времени считалось, что быстрый гидролиз регуляторных пептидов в желудочно-кишечном тракте не позволяет вводить их внутрь. Однако к настоящему

времени получены экспериментальные данные, свидетельствующие о протекторных противоязвенных эффектах глипролина PGP при внутрижелудочном введении крысам и о возможности выявления этого пептида и его метаболитов в крови кроликов [3, 5]. Принимая это во внимание, важно изучить фармакокинетику трипептида PGP при введении внутрь крысам и возможность его выявления в разных органах в течение 5 ч после введения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных самцах белых крыс массой 250 г после 18 ч голодания. Меченный тритием PGP (1 мкюри/мл) получали методом высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена водорода на тритий. Этот метод позволяет сохранять как физико-химические свойства, так и биологическую активность исходного пептида [5, 13]. [³H]PGP вводили внутрь с помощью металлического зонда (50 мккюри на животное) в смеси с немеченым пептидом (0,97 мкмоль на крысу). Животных умерщвляли через 15, 30, 60, 180 и 300 мин после введения пептида. Кровь (2,5 мл) собирали из яремной вены в пробирку с 3,8 % цитратом натрия (соотношение кровь/консервант — 9/1), центрифугировали (900 g, 10 мин), отбирали плазму. Белки плазмы осаждали ацетнитрилом. Радиоактивность высчитывали отдельно для плазмы без белков и белков плазмы. Мозг, желудок, тонкий кишечник с двенадцатиперстной кишкой, печень, почки и сердце извлекали на холоду, промывали в охлажденном физиологическом растворе и подсушивали фильтровальной бумагой. Все тканевые

¹ Кафедра физиологии человека и животных (зав. — акад. РАМН И. П. Ашмарин) Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 119992, Воробьевы горы, 1/12.

² Отдел химии физиологически активных веществ (зав. — акад. РАН Н. Ф. Мясоедов) Института молекулярной генетики РАН, Москва, 123182, пл. Курчатова, 2.

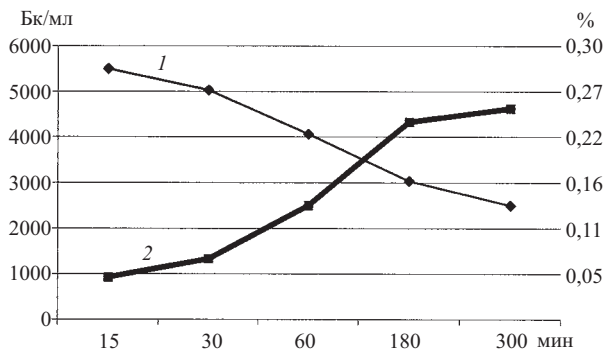


Рис. 1. Определение уровня радиоактивной метки в плазме (после осаждения белков) и белках плазмы крови крыс после введения внутрь [^3H] PGP.

По оси абсцисс — время взятия крови; по оси ординат — удельная радиоактивность, Бк/мл (справа приведены соответствующие проценты от введенной радиоактивности на 1 мл): 1 — плазма (без белка); 2 — белок плазмы.

препараты замораживали при -20°C сразу после их получения.

Экстрагирование PGP, PG и GP из тканей проводили путем гомогенизирования в 80 % ацетонитриле (соотношение масса образца/объем растворителя 1/10). Гомогенаты центрифугировали (4600 g, 15 мин, 4°C), отбирали супернатант и высушивали его в роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в метаноле из расчета 1 г исходной ткани на 10 мл метанола. Раствор центрифугировали при тех же условиях, супернатант снова высушивали в роторном испарителе, сухой остаток растворяли в 2 мл дистиллированной воды. 200 мкл из каждой пробы добавляли к 5 мл сцинтиллятора Ready Gel, выдерживали 20 мин и определяли уровень радиоактивности (Бк/мл или Бк/г) на жидкостном сцинтилляционном счетчике Beckman LS-9800. Принимая во внимание объем плазмы и вес органов радиоактивность плазмы и органов рассчитывали в процентах к введенной радиоактивности. Учитывая значительность сроков распада PGP, PG и GP ($\tau_{1/2} < 24$ ч) и особенности растворимости пролина и глицина в метаноле, можно считать, что в экстракты для определения радиоактивности, полученные в течение первых часов после введения, переходят практически только глипролины.

В специальной серии экспериментов у 10 крыс, помещенных в клетки с решетчатым дном и жестяным поддоном в виде воронки, из которой жидкость стекала в мерную пробирку, каждые два часа собирали мочу и определяли ее количество в течение 8 ч после введения внутрь меченного тритием PGP (50 мкюри на животное) в смеси с немеченым пептидом (0,97 мкмоль на крысу). Мочу, собранную у всех животных за один промежуток времени, т.е. за 2 ч (проба), сливали вместе, смешивали с 0,1 н. HCl в соотношении 1:25 (HCl/моча) и немедленно замораживали при температуре более -24°C . 10 мл размороженной мочи от каждой пробы упаривали досуха, растворяли в 200 мкл

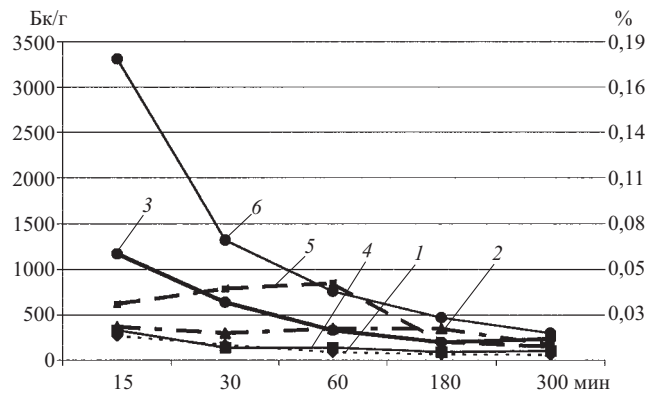


Рис. 2. Определение уровня радиоактивной метки в некоторых органах крысы после введения внутрь [^3H] PGP.

По оси абсцисс — время после введения; по оси ординат — удельная радиоактивность, Бк/г (справа приведены соответствующие проценты от введенной радиоактивности 1 г на орган); 1 — печень, 2 — почки, 3 — желудок, 4 — мозг, 5 — сердце, 6 — тонкий кишечник.

воды, добавляли 5 мкл ТФУ (трифторуксусная кислота) и разводили в 0,8 мл AN (80 % ацетонитрил), встряхивали минуту и центрифугировали; затем собирали супернатант, упаривали досуха, растворяли в 100 мкл воды и определяли уровень радиоактивности в моче. Полученную радиоактивность в Бк/мл переводили в проценты от введенной радиоактивности и, исходя из объема мочи, определяли количество выводимой радиоактивности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из данных литературы, что количество крови крысы составляет $\approx 6\%$ от массы тела, при этом равное содержание плазмы и белков крови [8, 9] рассчитали, что на крысу массой 250 г приходится 7,5 мл плазмы. Общую радиоактивность высчитывали, умножая удельную радиоактивность на объем плазмы или белков.

Определение радиоактивности в плазме крови крыс после осаждения белков показало, что наибольшая радиоактивность в плазме наблюдается через 15 мин после введения внутрь меченного тритием PGP и составляет 5500 Бк/мл (рис. 1), что соответствует 0,3 % от введенной радиоактивности. Учитывая объем плазмы, без содержащихся в ней белков (5,62 мл) общая радиоактивность плазмы через 15 мин составляет 1,69 % от введенной радиоактивности. В дальнейшем происходит ее постепенное снижение до 1,52; 1,24; 0,9 и 0,79 % через 30, 60, 180 и 300 мин соответственно.

Надо отметить, что эта радиоактивность отражает суммарную активность трипептида PGP и его дипептидных метаболитов PG и GP. Необходимо также учитывать, что в организме не исключено образование ацетилированных, метилированных и гидроксированных форм PGP и его метаболитов, которые не определялись.

Факт выявления пептидов в крови через 15 мин свидетельствует о стабильности глипролинов к протеазам желудочного сока и о возможности их быстрого проникновения в кровяное русло. В плазме пептиды также устойчивы к гидролизу: они медленно распадаются таким образом, что даже через 5 ч в плазме находится определяемое количество радиоактивности около 0,8 %. В результате протеолиза пептиды в крови разрушаются до аминокислот, которые в свою очередь могут включаться в синтез белков. Поэтому радиоактивность белков, осажденных в 1 мл плазмы, наоборот, со временем возрастает от 0,05 до 0,25 % (рис. 1) и с учетом объема белков плазмы (1,88 мл) составляет 0,1; 0,13; 0,26; 0,43 и 0,47 % через 15, 30, 60, 180 и 300 мин соответственно.

Сопоставление уровня радиоактивности в плазме крыс после внутрижелудочного (1,79 %) и внутрибрюшинного (6 %) [3] введения метки показывает, что при введении внутрь пептида в крови обнаруживается вдвое меньше; скорее всего, это связано с разрушением PGP пептидазами желудочно-кишечного тракта.

Данные о проникновении меченого пептида из желудочно-кишечного тракта в кровяное русло крыс и его максимальной концентрации в плазме на 15-й минуте (1,79 %) совпадают с результатами экспериментов на кроликах (5,6 %) [5], хотя определяемая радиоактивность в плазме крыс почти в три раза меньше, что может быть связано с более интенсивным обменом веществ у этих животных.

Значительно меньшее процентное содержание PGP и его метаболитов выявлено в исследуемых органах (рис. 2). В пересчете на массу органа через 15 мин после введения радиоактивной метки наибольшее ее количество наблюдается в тонком кишечнике (1,4 %); в желудке — 0,1 % и мозге — 0,03 %.

Через 30, 60 и 180 мин радиоактивность в этих органах уменьшается, но даже через 5 ч отмечается некоторое ее количество: 0,01 % — в желудке, 0,16 % — в кишечнике и 0,01 % — в мозге. Обнаружение радиоактивной метки в мозге после внутрижелудочного введения [³H]PGP свидетельствует о возможности проникновения трипептида и/или его метаболитов через гематоэнцефалический барьер, а, значит и о возможности центральных эффектов глипролинов.

Факт присутствия определенного уровня радиоактивности, связанной с глипролинами в желудке в течение 5 ч очень важен, если предположить, что хотя бы часть описанных выше противоязвенных эффектов могут осуществляться через влияние этих пептидов непосредственно на ткани желудка.

Радиоактивность печени, составляющая 0,09% через 15 мин после введения, к 60-й минуте практически не регистрировалась. Почки поддерживали радиоактивность на уровне около 0,04 % в течение трех часов после введения.

Несколько иная картина наблюдается для сердца. Через 15 мин после введения в сердце находится

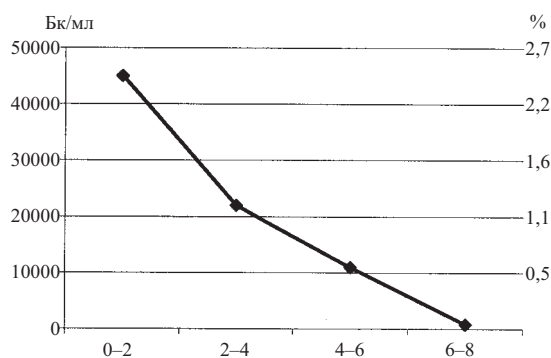


Рис. 3. Радиоактивность в моче крыс после введения внутрь [³H] PGP.

По оси абсцисс — время, ч; по оси ординат — удельная радиоактивность, Бк/мл (справа приведены соответствующие проценты от введенной радиоактивности на 1 мл).

0,03 % от введенной радиоактивности. В дальнейшем в отличие от всех других органов, в сердце наблюдается небольшое увеличение радиоактивности, которое к 60-й минуте достигает почти 0,05 %, а затем резко падает к 180-й минуте.

Таким образом, суммарная радиоактивность крови, сердца, печени, желудка, тонкого кишечника, почек и мозга через 15, 30, 60, 180 и 300 мин составляет примерно 3,41; 2,42; 1,95; 1,65 и 1,48 % от введенной радиоактивности соответственно, что отражает процентную локализацию глипролинов и их метаболитов в исследуемых органах и плазме крови.

Определяемое количество глипролинов (PGP и/или его дипептидных метаболитов PG и GP) в крови крыс в течение 5 ч представляет большой интерес, так как свидетельствует об относительной стабильности этих пептидов к протеолизу в желудке и/или в тонком кишечнике и к пептидазам крови.

Определение радиоактивности в моче крыс, которую собирали каждые два часа в течение 8 ч после введения меченого трипептида, показало, что в течение первых двух часов после введения радиоактивность в моче составляет 45000 Бк/мл (рис. 3). Таким образом, принимая во внимание, что за два часа суммарный объем мочи крысы в среднем составляет 3,2 мл, в первые два часа выводится только 8 % введенной радиоактивности.

В период от двух до 4 ч активность выведения радиоактивности с мочой падает более чем вдвое и с учетом объема выводимой жидкости составляет 3 % от введенного количества. В последующие два часа радиоактивность падает еще более чем в два раза, а через 6 – 8 ч радиоактивность в моче практически не обнаруживается. Следует подчеркнуть, что обнаруженная в моче радиоактивность не связана с пептидами. Известно, что белки, молекулы которых относительно малы, могут проникать из крови в клубочковый инфильтрат, однако большинство таких белков эффективно подвергаются обратному всасыванию [7]. Следова-

льно, ни введенный пептид, ни его дипептидные метаболиты с мочой не выводятся. Не исключено, что выявляемая в моче радиоактивность связана с небольшим количеством продуктов распада - аминокислот. Имеются сведения, что незначительное количество глицина выводится с мочой [12]. Пролин и глицин, поступая в печень вместе с другими аминокислотами путем всасывания из желудочно-кишечного тракта, могут вступать в реакции катаболизма с образованием NH_3 для образования мочевины [7]. Вероятно, определенная часть радиоактивности связана с мочевиной, образовавшейся из пролина и глицина после гидролиза небольшой части меченого трипептида.

Итак, с мочой за 8 ч выводится примерно 12 % радиоактивности, т.е. продуктов метаболизма глипролинов. На этом основании следует полагать, что большая часть метаболитов введенного пептида остается в организме и далее в течение первых 2 – 3 сут участвует в образовании новых пептидов и белков, включаясь и в синтез коллагена.

ВЫВОДЫ

При внутрижелудочном введении [^3H]PGP в плазме крови крыс через 15 мин были обнаружены PGP и его метаболиты (почти 1,8 % от введенной радиоактивности); даже через 5 ч их концентрация составила около 0,8 %. Наибольшая радиоактивность в кишечнике, желудке, печени, мозге, сердце и почках наблюдалась через 15 мин; через 5 ч в этих органах были выявлены сотые процента от введенной радиоактивности. В

моче PGP и его пептидные метаболиты не были обнаружены.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева, Л. А. Ляпина, Г. Е. Самонина, *Биохимия*, **63**(2), 5 – 11 (1998).
2. И. П. Ашмарин, А. А. Каменский, Л. А. Ляпина, и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **2**, 24 – 27 (2002).
3. Б. В. Васьковский, Ю. А. Золотарев, С. Е. Жуйкова, и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **3**, 41 – 45 (2003).
4. С. Е. Жуйкова, К. Е. Бадмаева, Г. Е. Самонина, Л. Г. Плещкая, *Экспер. и клин. гастроэнтерол.*, **4**, 88 – 92 (2003).
5. Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, Б. В. Васьковский и др., *Биоорган. химия*, **26**(7), 512 – 515 (2000).
6. Ю. А. Золотарев, С. Е. Жуйкова, И. П. Ашмарин, Н. Ф. Мясоедов и др., *Бюл. экпер. биол.*, **135**(4), 423 – 426 (2003).
7. У. Мак-Мюррей, *Обмен веществ у человека*, Изд. Мир, Москва (1980).
8. В. Н. Крылов, Е. В. Ястребова, *Введение в экспериментальную хирургию*, Изд. Нижегород. госунивер., Нижний Новгород (1998).
9. D. N. Darlington and M. J. Tehrani, *J. Appl. Physiol.*, **83**(5), 1648 – 1653 (1997).
10. G. Samonina, L. Lyapina, G. Kopylova, V. Pastorova et al., *Pathophysiol.*, **7**, 69 – 73 (2000).
11. G. Samonina, I. Ashmarin, and L. Lyapina, *Pathophysiol.*, **8**, 229 – 234 (2002).
12. Ch. P. Smith, G. T. Samogyi, E. T. Bird, et al., *Brain Res. Protocols*, **9**, 57 – 64 (2002).
13. Yu. A. Zolotarev, A. K. Dadayan, E. V. Bocharov, and Yu. A. Borisov et al., *Amino Acid*, **24**, 325 – 333 (2003).

Поступила 22.09.03

PHARMACOKINETICS OF GLYPROLINES (PGP) UPON INTRAGASTRIC ADMINISTRATION

E. V. Bakaeva¹, G. E. Samonina¹, L. A. Andreeva², Yu. A. Zolotarev², V. S. Kozik², I. P. Ashmarin¹, and N. F. Myasoedov²

¹ Human and Animal Physiology Chair, Department of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory 1/12, Moscow, 119992 Russia

² Department of Chemistry of Physiologically Active Substances, Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

The pharmacokinetics of glyprolines upon intragastric administration in rats was studied by monitoring the content of tritium-labeled PGP in the blood plasma and protein, in organs (for 5 h), and urine (for 8 h). The maximum radioactivity (2.25 % of the introduced level) in the blood plasma was observed 15 min after administration of [^3H]-PGP. Then, the radioactivity level gradually decreased, but even in 5 h it exceeded 1 %. In contrast, the radioactivity of deposited protein gradually increased. The content of labeled PGP and its metabolites in organs was much lower than in the blood. The radioactivity 15 min after administration was as follows (%): intestine, 1.4; stomach, 0.1; liver, 0.09; brain, heart, and kidney, < 0.05; in 5 h, the radioactivity level was below 0.02 % (except for intestine, where it was still greater than 0.1 %). No labeled PGP or its metabolites were found in the urine during the 8-h period of observations. It is not excluded that glyprolines introduced with PGP are involved in the synthesis of new peptides and proteins, including collagen.