

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕЧЕНИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЦЕФАЗОЛИНА****С. Н. Тихонов, К. А. Ротов, В. В. Алексеев, Е. А. Снатенков, Н. П. Храпова***Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт*

Представлены данные по получению липосомального цефазолина, оценены его физико-химические свойства. При сравнительном анализе влияния цефазолина в свободной и липосомальной формах на ферментативную функцию печени установлено, что иммобилизация антибиотика в нанолипосомы предохраняла клетки печени от функциональных нарушений.

Ключевые слова: антибиотик, цефазолин, нанолипосомы, ферменты печени.

**ENZYMATIC ACTIVITY OF LIVER IN EXPERIMENTAL ANIMALS UPON
INTRODUCTION OF LIPOSOMAL ZEFAZOLIN****S. N. Tikhonov, K. A. Rotov, V. V. Alekseev, E. A. Snatenkov, N. P. Khrapova**

The paper presents data on the production of liposomal preparation of cefazolin, with evaluation of its physical and chemical properties. A comparative study of the influence of cefazolin in its free and liposomal forms on the activity of liver enzymes in white mice determined that immobilization of antibiotics in nanoliposomes decreased their inhibitory action on protease, alkaline phosphatase and phosphorylase.

Key words: antibiotics, cefazolin, nanoliposomes, liver enzymes.

Многие антибактериальные препараты обладают побочным действием на макроорганизм. Одним из критериев токсичности используемых препаратов могут служить происходящие при этом изменения активности ферментов.

Литературные данные по воздействию липосомальных форм антибиотиков на ферментативную функцию тканей животных противоречивы. Ряд авторов [10, 12] изучили влияние свободного и липосомального рифампицина на активность сукцинатдегидрогеназы в органах мононуклеарной фагоцитарной системы. Введение рифампицина в липосомах уменьшало его токсическое и иммунодепрессивное действие, оптимизировало активность фермента и выступало как средство иммунокорригирующей терапии. А. И. Сытник с соавт. [9] проводили исследования по изучению взаимодействия альдолазы А с лецитиновыми липосомами. С помощью методов флуоресцентной спектроскопии и триптофановой фосфоресценции при комнатной температуре ими показано, что альдолаза А связывается с лецитиновыми липосомами. При этом было отмечено увеличение микровязкости фосфолипидного бислоя, а также изменение конформации гидрофобного ядра фермента. В результате исследования зависимости вязкости мембран от времени их инкубации с альдолазой А установлено, что фермент-мембранное взаимодействие происходит практически мгновенно, а не путем постепенного встраивания белка в фосфолипидный бислой. У связанного с липосомами фермента уменьшается жесткость гидрофобного

ядра и изменяется каталитическая активность. При длительном подкожном введении липосом авторы наблюдали резкое увеличение активности органоспецифических ферментов (гистидазы, урокиназы), что связали с повреждением печеночных клеток, так как данные ферменты локализуются в печени.

Данные литературы подтверждают целесообразность изучения влияния липосомальных форм антибиотиков на активность ферментов печени.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Сравнительное изучение ферментативной функции печени при введении липосомального и свободного цефазолина натрия в эксперименте.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Липосомальную форму цефазолина натрия готовили методом выпаривания и обращения фаз из хроматографически чистых лецитина (Харьковский завод бактериальных препаратов), холестерина («Serva», Германия) в весовом соотношении 7:3 [13], при этом использовали антибиотик фирмы «ELI LILLY ITALIA S.p.A.». Для оценки включения в липосому антибиотика последний растворяли в забуференном физиологическом растворе pH 7,2 в конечной концентрации 150 ЕД/мл. Отделение невключившегося антибиотика проводили после центрифугирования при 20000 об/мин в течение часа на центрифуге «Ja-21» «Beckman» (США). Количество включенного в липосомы антимикробного препарата определяли микробиологическим методом [2]. Степень окисления ли-

пидов мембраны фосфолипидных везикул оценивали по перекисному индексу Клейна [11].

Для определения влияния свободных и липосомальных форм антибиотиков на активность ферментных систем печени использовали следующие препараты: липосомальный цефазолин натрия (6,6 мг/мл); цефазолин натрия (6,6 мг/мл); 0,15 М раствор NaCl, pH 7,2.

Трем группам белых мышей с массой 18–20 г (по 9 животных в каждой группе) однократно внутрибрюшинно вводили по 0,3 мл каждого из указанных препаратов. Через 2, 4 и 24 ч у 3 животных из каждой группы экстирпировали печень, образцы которой объединяли внутри групп и готовили гомогенаты из расчета 1:24 в 0,15 М растворе NaCl, pH 7,2. В полученных препаратах изучали уровень ферментативной активности.

Активность щелочной фосфатазы определяли с хромогенным субстратом p-нитрофенилфосфатом [9], протеазы — по методу Л. П. Алексеенко [1], аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) — по В. В. Умбрейту с соавт. в нашей модификации [4], фосфорилазы-0 — по методу М. Г. Смирновой [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из представленных данных на рис. 1, под влиянием свободного цефазолина натрия через 2 ч после его введения активность протеазы снижалась почти в 3 раза по сравнению с контролем, через 4 ч восстанавливалась до величины, определяемой в группе, которой был введен препарат в липосомальной форме, и через 24 ч оставалась на том же уровне (в 1,3 раза более низком, чем в контрольной группе животных). Уровень активности протеазы в печени мышей, получивших включенный в липосомы антибиотик, во все сроки определения был близок к таковому в контрольной группе (рис. 1).

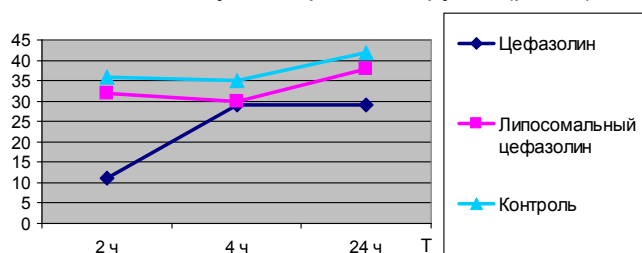


Рис. 1. Динамика активности протеазы в гомогенатах печени белых мышей после введения цефазолина в свободной и липосомальной формах:

С — показатель активности (условные единицы — Ех100, где Е — уровень экстинкции), Т — время, ч

Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что через 2 ч после введения как свободного, так и липосомального цефазолина, активность щелочной фосфатазы не отличалась от уровня контроля. Через 4 ч по сравнению с величиной в контрольной группе она была на 30 % ниже у животных, которым

вводился цефазолин, и на 20 % ниже у мышей, инъецированных антибиотиком, включенным в липосомы. Через 24 ч активность фермента в печени белых мышей обеих опытных групп восстанавливалась до контрольного уровня.

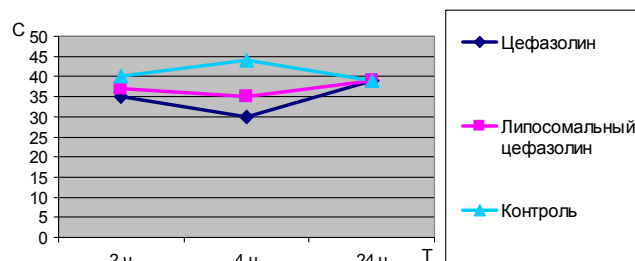


Рис. 2. Динамика активности щелочной фосфатазы в гомогенатах печени белых мышей после введения цефазолина в свободной и липосомальной формах: С — показатель активности (условные единицы — Ех100, где Е — уровень экстинкции), Т — время, ч

Влияние свободной и липосомальной форм цефазолина на активность АТФ-азы показано на рис. 3. Через 2 ч после введения свободного антибиотика наблюдалось резкое снижение активности фермента (в 3 раза по сравнению с таковой в контрольной группе), а у животных, получивших липосомальную форму препарата, она сохранялась на уровне контроля. Через 4 ч в группе животных, которым вводили цефазолин, ферментативная активность оставалась на том же уровне, и почти до этих же величин снижалась у мышей, которым был введен липосомальный цефазолин. Через 24 ч активность АТФ-азы достигала контрольных величин у мышей, получавших свободный антибиотик, и была несколько ниже в группе с его липосомальной формой.

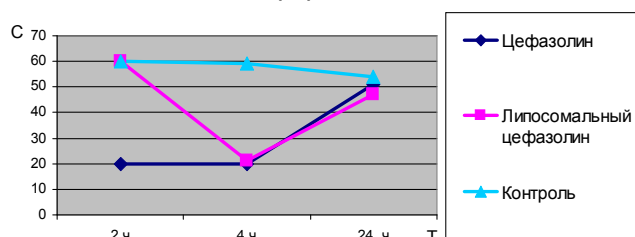


Рис. 3. Динамика активности АТФ-азы в гомогенатах печени белых мышей после введения цефазолина в свободной и липосомальной формах:

С — показатель активности (условные единицы — Ех100, где Е — уровень экстинкции), Т — время, ч

Анализ динамики фосфорилазы под влиянием цефазолина (рис. 4) показывает, что активность этого фермента снижалась уже через 2 ч после введения антибиотика: в 6,5 раз под действием свободной и в 2 раза — липосомальной формы препарата. Через 4 ч в группе, получавшей свободный цефазолин, активность ингибировалась полностью и уже больше не восстанавливалась в течение последующих часов. У мышей, инъецированных липосомальной формой препарата, через 4 ч она снижалась в 5 раз по

сравнению с контролем, где, напротив, в это время наблюдалось ее некоторое повышение, сохранявшееся на этом уровне и через 24 ч. В группе мышей, которым вводился антибиотик, включенный в липосомы, через 24 ч отмечалась тенденция к восстановлению активности фермента, хотя величина ее была в 4 раза ниже уровня контроля.

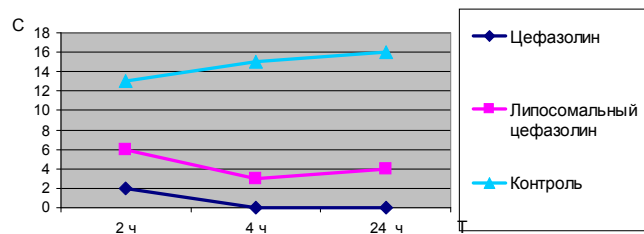


Рис. 4. Динамика активности фосфорилазы в гомогенатах печени белых мышей после введения цефазолина в свободной и липосомальной формах.: C — показатель активности (условные единицы — Ех100, где Е —уровень экстинкции), Т — время, ч

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при изучении динамики изменения активности протеазы, фосфатазы, АТФ-азы и фосфорилазы в печени белых мышей под действием цефазолина отмечена тенденция ингибирования всех этих ферментов в первые часы после введения свободного антибиотика. Использование липосомальной формы цефазолина предохраняло энзимы от его токсического действия. По-видимому, наиболее информативными, отражающими токсичность свободной и щадящее влияние липосомальной формы цефазолина являются такие ферменты, как фосфорилаза и фосфатаза.

Известно, что антибиотики при соответствующей концентрации в макроорганизме нарушают ряд метаболических процессов [4]. Рядом авторов показано угнетение активности фосфатазы, альдолазы и фосфорилазы в гомогенатах печени белых мышей после введения им тетрациклина, римфапицина и линкомицина, которое уменьшалось включением антибиотиков в липосомы [5, 6, 7].

Полученные нами результаты по влиянию цефазолина натрия в свободной и липосомальной форме на активность ряда ферментов печени белых мышей дополняют информацию о перспективности включе-

ния антибиотиков в липосомы для снижения их токсического действия на макроорганизм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Л. П. // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1968. — С. 9—11.
2. Дмитриева В. С. Микробиологический контроль активности антибиотических препаратов. — М.: Медицина, 1965. — 112 с.
3. Кашкин К. П., Караев З. О. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия. — Л.: Медицина, 1984. — 199 с.
4. Климова И. М. Влияние токсина чумного микроба на углеводно-фосфорный обмен печени животных: дис. ... канд. биол. наук. — Иркутск, 1966. — 209 с.
5. Ротов К. А., Перепелкин А. И., Климова И. М. и др. // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. научной конф., посвящ., 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (30 ноября — 1 декабря 1998). — С. 205.
6. Ротов К. А., Тихонов Н. Г., Петров В. И., и др. // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. научной конф., посвящ., 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (30 ноября — 1 декабря 1998). — С. 206.
7. Ротов К. А., Тихонов С. Н., Храпова Н. П. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины РАМН. — 2008., Т. — 145., № 4. — С. 421—424.
8. Смирнова М. Г. О фосфорилазе кожи // Биохимия. — 1956. — Т. 21. — С. 441—443.
9. Сытник А. И., Чумаченко Ю. В., Воловик З. Н., Демченко А. П. // Украинский биохимический журнал. — 1988. — Т. 60, № 2. — С. 66—72.
10. Цыганенко А. Я., Благый Ю. П., Васильченко В. Н. // Препринт физико-технического института низких температур АН УССР. — Харьков, 1988. — № 51. — 41 с.
11. Klein R. A. // Biochim. et biophys. acta. — 1970. — № 210. — Р. 486—489.
12. Poste G., Fidler I. J. // Manual of Macrophage Methodology. — New York, 1981. — Р. 431—438.
13. Szoka F., Papahadjopoulos D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75, № 9. — Р. 4194—4198.

Контактная информация

Алексеев Владимир Валерьевич — доктор медицинских наук, профессор, директор Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru