

СВЯЗЫВАНИЕ АНДРОГРАФОЛИДА БЕЛКАМИ КРОВИ

Г.В.Мамиконян¹, А.В.Кочикян¹, А.С.Оганесян¹, А.Г.Паносян¹,
Э.С.Габриэлян¹, Г.Викман²

¹Лаборатория контроля качества лекарств при Агентстве по лекарствам
и медицинским технологиям МЗ РА,

²Шведский институт растений, Гетеборг, Швеция/
375051 Ереван, ул. Комитаса, 49/4

Ключевые слова: андрографолид, альбумин, связывание белками плазмы крови, равновесный диализ

Андрографолид — активный ингредиент растения *Andrographis paniculata* N., издавна применяемого в традиционной китайской и индийской медицине для лечения насморка, гриппа, болезней горла, герпеса и других инфекционных заболеваний [1]. Лекарственные препараты, приготовленные на основе экстрактов *Andrographis paniculata* N., в настоящее время достаточно широко применяются для профилактики и лечения простудных заболеваний, синуситов, болезней верхних дыхательных путей [2,4].

Фармакологический эффект лекарств в немалой степени обусловлен скоростью всасывания, распределения и элиминации в организме. Одним из факторов, влияющих на процессы распределения и элиминации лекарств, является их способность взаимодействовать с белками крови, особенно с сывороточным альбумином. Во многих случаях степень связывания зависит не только от химической структуры препаратов, но и от количественного и конформационного состояния белков. Так, при многих заболеваниях (инфекционные, сердечно-сосудистые, легочные и т.д.) изменяется уровень сывороточных белков и их способность связывать лекарства. Причем в некоторых случаях основные изменения затрагивают альбуминовые, а в других глобулиновые фракции белков крови [5]. В связи с этим для точного расчета режима дозирования лекарств важно знать, в какой степени и с какими фракциями белков связывается его активный ингредиент.

Цель настоящего исследования — изучить связывание андрографолида сывороточным альбумином и белками сыворотки крови.

Материал и методы

В работе использованы:

- Андрографолид (АНД) в качестве аналитического стандарта, полученный от Шведского института растений;
- Бычий сывороточный альбумин (БСА) (Serva);
- Пропил 4-гидроксibenзоат в качестве внутреннего стандарта (Aldrich);
- Инкубационная смесь pH=7.34, состоящая из 822 ммоль/л NaCl, 16.2 ммоль/л KCl, 60 ммоль/л фосфатного буфера (Sigma);
- Плазма крови, полученная сразу после отбора донорской крови;
- Диализный мешок (Serva);
- Метанол (Aldrich).

Связывание андрографолида белками сыворотки крови изучали методом равновесного диализа [8]. В диализный мешок из полупроницаемой мембраны, содержащий 0.9 мл раствора БСА в разных концентрациях ($2.8 \cdot 10^{-4}$ М, $2.8 \cdot 10^{-5}$ М и $2.8 \cdot 10^{-6}$ М) или плазму крови, добавляли раствор андрографолида в количестве 0.1 мл (конечная концентрация — 29 мкг/мл, ~ 0.1 мкмоль). Диализный мешок погружали в камеру, заполненную 5 мл инкубационной смеси. Диализ проводили при температуре 37°C и постоянном перемешивании. Каждые 60 мин отбиралось аликвотное количество инкубационной смеси в объеме 0.03 мл для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Изъятие проб прекращалось после наступления кинетического равновесия, когда концентрация андрографолида во внешнем растворе не менялась или колебалась в пределах 10%. Образцы для ВЭЖХ-анализа были приготовлены смешиванием отобранных проб с равным объемом раствора внутреннего стандарта с концентрацией 100 мкг/мл. Для определения степени адсорбции андрографолида на мембране диализного мешка проводились контрольные опыты, в которых в диализный мешок добавлялся раствор БСА без андрографолида (контроль А) и раствор андрографолида без БСА (контроль Б).

Степень связывания андрографолида белками в момент равновесия (С, %) подсчитывали по формуле согласно следующему уравнению [7]:

$$C = \frac{d}{a-b} \cdot 100,$$

где d — содержание андрографолида, добавленного в диализный мешок (29 мкг); a — содержание андрографолида в инкубационной смеси в момент равновесия (мкг); b — содержание андрографолида, оставшееся в диализном мешке в контроле Б (мкг).

Количественное содержание андрографолида определялось методом внутреннего стандарта при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа фирмы Beckman. Разделение проводилось на обращеннофазной колонке LiChroCART размером 125 x 4 мм, наполненной LiChrospher 100 RP-18 с размером частиц 5 мкм (фирма Merck). В качестве подвижной фазы была использована смесь метанола и воды в объемном соотношении 60:40. Скорость подвижной фазы — 0.7 мл/мин. Регистрация пика андрографолида велась при 229 нм. Подвижную фазу готовили перед каждой серией анализов, фильтровали и дегазировали 5 мин при помощи ультразвука. Опознание андрографолида проводилось по относительному времени удерживания (табл. 1).

Таблица 1

Время удерживания андрографолида и внутреннего стандарта

Компонент	Время удерживания R_t , мин	Относительное время удерживания, $R_s = R_{t \text{ анал}} / R_{t \text{ вст}}$
Андрографолид	3.58	0.51
Внутренний стандарт	6.94	1.00

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что кинетическое равновесие при всех трех концентрациях БСА наступает в интервале 3–5ч после начала диализа (табл. 2, 3, 4)

Таблица 2

Степень связывания андрографолида БСА ($2.8 \cdot 10^{-6}$ М) после наступления кинетического равновесия, %

Инкубация	Время, ч			
	1	2	3	4
АНД + БСА	16,2	25	19,3	27,9
АНД+БСА	23.8	0	7.2	27.9
АНД+БСА	6.5	0	0	0
АНД+БСА	11.7	26.7	15.8	3.7
Среднее значение	14.55	12.925	10.575	14.875
Стандартная ошибка	3.66	7.47	4.34	7.55
Стандартное отклонение	7.33	14.9	8.69	15.11

Таблица 3

Степень связывания андрографолида БСА ($2.8 \cdot 10^{-5}$ М) после наступления кинетического равновесия, %

Инкубация	Время, ч		
	1	2	3
АНД+БСА	8.6	55.	32.76
АНД+БСА	6.9	50	32.75
АНД+БСА	—	—	50
АНД+БСА	—	—	60.3
АНД+БСА	—	—	44.8
Среднее значение	7.75	52.5	43.95
Стандартная ошибка	0.8	2.5	6.8
Стандартное отклонение	1.2	3.53	13.6

Таблица 4

Степень связывания андрографолида БСА ($2.8 \cdot 10^{-4}$ М) после наступления кинетического равновесия, %

Инкубация	Время, ч				
	1	2	3	4	5
АНД+БСА	64.8	62.1	70.0	55.2	62.1
АНД+БСА	53.4	74.8	66.5	53.4	65.5
АНД+БСА	56.2	—	60.3	72	70.7
АНД+БСА	43.1	46.5	64.8	48.2	46.5
АНД+БСА	—	53.4	63.8	56.9	—
АНД+БСА	—	—	60.3	50.0	—
Среднее значение	54.37	59.2	64.28	55.95	61.2
Стандартная ошибка	4.47	6.1	1.53	3.46	5.2
Стандартное отклонение	8.94	12.2	3.7	8.5	10.4

Как видно из табл. 2–4, при снижении концентрации БСА степень связывания андрографолида пропорционально уменьшается (рис.). Количественная оценка степени связывания андрографолида, проведенная методом Scatchard [7] с помощью компьютерной программы "Dose-effect Analysis with Microcomputers software, 1987", показала, что константа связывания андрографолида БСА составляет 2.59, число центров связывания БСА — 5.52, а максимально возможная степень связывания андрографолида — 79.2%.

Результаты исследования связывания андрографолида белками плазмы крови человека показали, что кинетическое равновесие, как и в случае связывания БСА, наступает через 4 часа после начала диализа (табл.5).

Таблица 5

Степень связывания андрографолида белками плазмы крови после наступления кинетического равновесия, %

Инкубация	Время, ч			
	1	2	3	4
АНД+плазма	23.4	37.91	48.3	46
АНД+плазма	22.4	48.2	55.1	58.6
АНД+плазма	3.4	25.8	32.7	52.7
АНД+плазма	13.1	13.8	25.8	50.0
Среднее значение	15.57	31.4	40.47	54.97
Стандартная ошибка	4.67	7.459	6.78	2.16
Стандартное отклонение	9.34	14.9	13.55	4.32

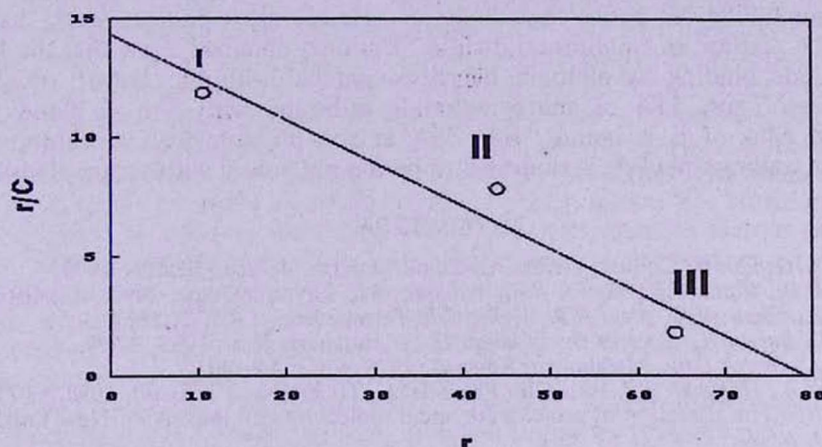


Рис. Связывание андрографолида разными концентрациями БСА;
 r — отношение концентрации связанного андрографолида к концентрации БСА;
 c — концентрация несвязанного андрографолида;
 I, II, III — концентрации БСА $2.8 \cdot 10^{-4}$, $2.8 \cdot 10^{-5}$ и $2.8 \cdot 10^{-6}$ М соответственно.

Таким образом, установлено, что 55% андрографолида связывается белками плазмы крови человека. Учитывая, что связывание андрографолида БСА при физиологической концентрации белка составляет 64%, можно предположить, что основным белком, неспецифически связывающим андрографолид, является альбумин. Выявленная закономерность уменьшения степени связывания андрографолида с уменьшением концентрации БСА может привести к увеличению свободной (эффективной) концентрации андрографолида в крови. Следовательно, возникает необходимость в коррекции доз андрографолида при патологических состояниях, сопровождаемых гипоальбуминемией.

Поступила 07.07.2000

ԱՆԴՐՈԳՐԱՖՈԼԻԴԻ ԿԱՊՈՒՄԸ ԱՐՅԱՆ ՍՊԵՏԱԿՈՒՅՆԵՐՈՎ
Գ.Վ. Մամիկոնյան, Ա.Վ. Դուրյան, Ա.Ս. Հովհաննիսյան, Ա.Գ. Փանոսյան,
Է.Ս. Գաբրիելյան, Գ.Վիկման

Հավասարակշիռ դիալիզի մեթոդով ուսումնասիրվել է *Andrographis paniculata* N. բույսի ակտիվ ինգրիդիենտ անդրոգրաֆոլիդի կապումը ցուլի շիճուկի ալբումինի և մարդու արյան շիճուկի սպիրակոցներով: Հասարակած է, որ անդրոգրաֆոլիդի կապման աստիճանը ալբումինի հետ նվազում է ալբումինի մակարդակի մեծացմանը զուգընթաց: Ալբումինի ֆիզիոլոգիական խտության դեպքում կապման աստիճանը կազմում է 64, իսկ մարդու արյան շիճուկի սպիրակոցների հետ՝ 55%, ինչը վկայում է այն մասին, որ օրգանիզմում անդրոգրաֆոլիդը հավանաբար կապվում է հիմնականում արյան ալբումինային ֆրակցիաների հետ:

ANDROGRAPHOLIDE BINDING BY BLOOD PROTEINS

G.V.Mamikonyan, A.V.Ghochikyan, A.S.Hovhannissyan, A.G.Panossian,
E.S.Gabrielian, G.Wikman

The extent of bovine serum albumin (BSA) and human plasma proteins binding with andrographolide, an active ingredient of *Andrographis paniculata* N., has been studied by the method of equilibrium dialysis. The data obtained show that the level of andrographolide binding by albumin decreases parallel with the growth of albumin concentrations. Thus, 55% of andrographolide is bound with human blood plasma proteins and 64% of it is bound with BSA at the physiological concentration. In human blood andrographolide is supposed to be mainly bound with serum albumin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bensky D., Gamble A. Chinese Herbal Medicine Materia Medica., Seattle, 1993.
2. Caceras D.D., Hanke J.L., Burgos R.A., Wikman G.K. Phytomedicine, 1997, 4(2):101.
3. Cava M.P., Chan W.R., Stein R.P., Willis C.R. Tetrahedron, 1965, 21:2617.
4. Hanke J., Burgos R., Caceres D., Wikman G. Phytotherapy Res., 1995, 9:559.
5. Jusco W.J., Greich Drug Metabolism Reviews, 1976, 5 (1): 43-149.
6. Ritschel W.A., Hammer G.V. Int.J.Clin.Pharmacol., Therapy and Toxicol., 1980, 18 (7), 298.
7. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. New York Acad. Sci., 1949, p.660.
8. Wagner J.G. Biopharmaceuticals and Relevant Pharmacokinetics. Hamilton, Illinois, 1971.