

Сравнительное исследование фармакокинетики рекомбинантной проурокиназы при субконъюнктивальном и инстилляционном методах введения

Э.В. Бойко², Т.Г. Сажин¹, А.С. Суворов¹, С.И. Алекперов³

¹ ФГКВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

² СПб филиал ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России

³ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург

Цель исследования — сравнить динамику концентрации рекомбинантной проурокиназы (РПУ) во влаге передней камеры глаза в зависимости от метода введения (инстилляций и субконъюнктивальная инъекция) с помощью флуоресцентной спектрофотометрии. **Материал и методы.** Пробы влаги передней камеры глаза получили у 62 пациентов (62 глаза), оперированных по поводу катаракты, с ригидным зрачком вследствие псевдоэксфолиативного синдрома, либо после перенесенного ранее острого иридоциклита. Пациенты были разделены на 2 группы: в 1-й введение РПУ осуществляли путем форсированных инстилляций (31 пациент, 31 глаз) раствором РПУ в концентрации 330 МЕ в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия непрерывно в течение 10 мин со скоростью 30 капель в минуту, во 2-й — путем субконъюнктивальной инъекции (31 пациент, 31 глаз) 0,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, содержащего 5000 МЕ РПУ. Для каждой пробы фиксировали время в минутах от момента введения РПУ до момента забора влаги. Концентрацию РПУ в пробах определяли методом флуоресцентной спектрофотометрии (НТАСНІ 650-60, Япония). **Результаты.** При форсированных инстилляциях РПУ определяется во влаге передней камеры глаза с 5-й минуты после введения с быстрым нарастанием концентрации в течение 30–60 мин до 3100 МЕ/мл, однако затем его концентрация уменьшается с периодом полувыведения в 160–180 мин, а при субконъюнктивальных инъекциях РПУ начинает определяться в те же сроки после введения, однако в течение 120–160 мин его концентрация увеличивается до 2500 МЕ/мл и только потом постепенно снижается с периодом полувыведения 320–360 мин. **Заключение.** Введение РПУ может быть использовано для лечения фибриноидного синдрома практически равноценно как методом субконъюнктивальных инъекций, так и методом форсированных инстилляций, что определяется достаточной концентрацией фермента во влаге передней камеры глаза. Характер фармакокинетики терапевтической концентрации препарата во влаге передней камеры глаза предполагает однократное субконъюнктивальное введение и допускает двухкратное применения инстилляций в течение суток.

Ключевые слова: фибриноидный синдром, рекомбинантная проурокиназа, флуоресцентная спектрофотометрия.

Российский офтальмологический журнал, 2017; 2: 18-22

Фибриноидный синдром осложняет течение многих глазных заболеваний, а также ухудшает исходы хирургического лечения пациентов с признаками перенесенного увеита [1], последствиями травмы глазного яблока, на фоне диабетического поражения органа зрения, а также при реоперации. Частота фибриноидного синдрома в

этих случаях, по данным разных авторов, может достигать 32–35 % [2, 3]. Лечение фибриноидного синдрома только противовоспалительными средствами не всегда предотвращает формирование синехий и фиброзных шварт [4], что требует дополнительного применения ферментов [5, 6].

Для эффективного фибринолиза необходимо локально создать достаточную терапевтическую концентрацию ферментного препарата [7]. В клинической практике применяют различные способы введения ферментных препаратов: в инстилляциях, субконъюнктивально, парабулбарно, с помощью сочетания с диод-лазерной аппликацией [8], путем длительной внутрикаротидной инфузии [9], эндовитреально [10, 11], с помощью физиотерапевтических методов [12, 13]. В последние годы для лечения фибриноидного синдрома, гифемы, а также гемофтальма успешно применяют рекомбинантную проурокиназу (РПУ). Однако данных, подтверждающих биодоступность и эффективность различных путей введения данного препарата, недостаточно. Субконъюнктивальные инъекции ферментных препаратов считаются наиболее эффективным способом введения, дающим положительный результат при воспалительных заболеваниях переднего сегмента глаза, однако часто сопровождаются осложнениями в виде развития гипосфагмы (1,5–1,7 % случаев), рубцевания (0,6–0,75 %) или некроза конъюнктивы в месте инъекций (0,06–0,075 %), а также прободением глазного яблока с частотой 0,003–0,006 % [14].

Наиболее простым и безопасным способом введения являются инстиллянии, однако возможность создания с их помощью достаточной концентрации РПУ во влаге передней камеры глаза, сравнимой с субконъюнктивальным введением, требует измерения: данные по фармакокинетике РПУ могут быть получены с помощью современного высокоточного спектрофотометрического метода.

ЦЕЛЬ работы: сравнить динамику изменения концентрации РПУ во влаге передней камеры в зависимости от метода введения (инстиллянии и субконъюнктивальное введение) с помощью флуоресцентной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие больные, оперированные по поводу катаракты в клинике офтальмологии Военно-медицинской академии (ВМедА). В соответствии с протоколом исследования от каждого больного было получено информированное согласие, оформленное согласно рекомендациям локального этического комитета ВМедА. Для исследования отбирали пациентов с ригидным зрачком вследствие псевдоэкзофиативного синдрома либо после перенесенного ранее острого иридоциклита, у которых после операции можно было предположить выпот фибрина в передний сегмент глаза. 62 пациента (62 глаза) были разделены на 2 группы: в 1-й введение РПУ осуществляли путем форсированных инстилляций (31 пациент, 31 глаз), во 2-й — путем субконъюнктивальной инъекции (31 пациент, 31 глаз). Пробы влаги передней камеры глаза получали в начале операции путем аспирации 0,1 мл влаги в стерильный инсулиновый шприц.

Для каждой пробы фиксировали время в минутах от момента введения РПУ до момента забора влаги, содержащей введенный препарат. Концентрацию РПУ определяли методом флуоресцентной спектрофотометрии на аппарате HITACHI 650-60 (Япония) с pH 6,0–7,5, с использованием калибровочной кривой, построенной по показателям флуоресценции растворов РПУ в стандартных разведениях в 0,9 % растворе хлорида натрия.

Форсированные инстиллянии проводили раствором препарата в концентрации 330 МЕ в 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия непрерывно в течение 10 мин со скоростью 30 капель в минуту. Общий объем инстилляций препарата составил 15 мл в концентрации 5000 МЕ РПУ. Применение РПУ в виде раствора для инстилляций не предусмотрено производителем препарата и выполнялось в рамках научного исследования с разрешения независимого этического комитета при ВМедА (протокол заседания комиссии № 168 от 17 ноября 2015 г.). При инстиллянии препарата отмечали наличие или отсутствие субъективных ощущений пациента в виде дискомфорта, жжения, а также признаков аллергической реакции в виде гиперемии и отека конъюнктивы. Субконъюнктивальные инъекции осуществляли стерильным инсулиновым шприцом путем введения под конъюнктиву нижнего свода 0,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, содержащего 5000 МЕ РПУ. Применение РПУ в виде раствора для субконъюнктивальных инъекций предусмотрено производителем препарата и выполнялось в полном соответствии с инструкцией.

Для определения концентрации РПУ во влаге передней камеры глаза в зависимости от времени, прошедшего от момента введения, забор проб осуществляли во временных интервалах от 5 мин до одних суток после введения.

Перед выполнением основной части работы определили показатели флуоресценции РПУ путем последовательного разведения препарата 0,9 % раствором хлорида натрия и фиксирования показателей флуоресценции при каждом разведении (табл.). При сканировании раствора препарата с концентраци-

Таблица. Показатели флуоресценции при растворении РПУ (гемазы) в 0,9 % растворе хлорида натрия

№ п/п	Концентрация раствора Гемазы, МЕ/мл	Показатель флуоресценции, ед. флуоресценции
1	5000	18,1
2	2500	9,0
3	1250	4,5
4	625	2,28
5	312,5	1,29
6	156,25	0,920
7	78,12	0,750
8	39,06	0,670

ей 5000 МЕ/мл также выявили, что длина волны возбуждения соответствует 294 нм, а длина волны эмиссии — 329 нм.

Далее, используя полученные показатели флуоресценции растворов РПУ с известной концентрацией, была построена калибровочная кривая зависимости величины флуоресценции от концентрации препарата (рис. 1).

Для определения базовой флуоресценции чистой влаги передней камеры (без введения препарата) у 30 пациентов перед операцией по поводу катаракты был сделан забор влаги передней камеры и определена базовая флуоресценция, которая в среднем составила $4,00 \pm 0,07$ ед. флуоресценции. Эту величину вычитали из показателей каждой пробы, оставшееся значение флуоресценции использовали для определения концентрации РПУ с помощью калибровочной кривой (рис. 1).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью стандартных процедур в среде Excel. Для описания зависимости концентрации РПУ от времени, прошедшего от момента введения, использовали экспоненциальную регрессию, параметры которой вычисляли с помощью стандартных статистических процедур.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе полученных значений концентрации РПУ во влаге передней камеры в зависимости от времени введения были построены экспоненциальные кривые для каждой группы пациентов: для 1-й, где введение препарата осуществлялось путем форсированных инстилляций, и для 2-й, где РПУ вводили путем субконъюнктивных инъекций (рис. 2).

Изменение концентрация РПУ от времени, прошедшего от момента введения, описывается экспоненциальной зависимостью с высокими значениями коэффициента детерминации: $y = 3346 e^{-0,006x}$, $R^2 = 0,9047$ для группы с форсированными инстилляциями, где y — концентрация препарата во влаге передней камеры, x — время, прошедшее с момента введения препарата.

Объем влаги передней камеры глаза составляет 1,23–1,32 мл (или см³). Согласно инструкции, в пе-

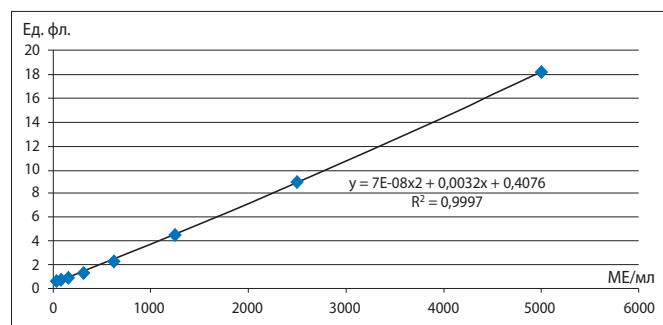


Рис. 1. Зависимость флуоресценции от концентрации РПУ в 0,9 % растворе натрия хлорида.

реднюю камеру глаза вводят 500 МЕ РПУ, тем самым создается концентрация от 406 МЕ/мл (при 1,23 мл) до 387 МЕ/мл (при 1,32 мл), в среднем 390 МЕ/мл.

Для аппроксимации данных, полученных в группе с субконъюнктивным введением, использовано логнормальное распределение и добавлен параметр масштаба $b:b = 150\,000$, $\mu = 6$, $\sigma = 1$.

$$f(t) = \frac{1500000}{\sqrt{2\pi t}} \exp\left(-\frac{(\ln(t) - 6)^2}{2}\right).$$

Для аппроксимации данных, полученных в группе с инстилляциями, использовано логнормальное распределение и добавлен параметр масштаба $b:b = 633\,667$, $\mu = 4,78$, $\sigma = 0,86$.

$$f(t) = \frac{b}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(\ln(t) - \mu)^2}{2\sigma^2}\right).$$

При анализе полученного графика зависимости концентрации РПУ во влаге передней камеры от способа и времени введения можно отметить следующее:

- при форсированных инстилляциях препарат определяется во влаге передней камеры глаза с 5-й минуты после введения с быстрым нарастанием концентрации в течение 30–60 мин до 3100 МЕ/мл, однако затем его концентрация уменьшается с периодом полувыведения, равным 160–180 мин;

- при субконъюнктивных инъекциях препарат после введения начинает определяться в те же сроки, однако в течение 120–160 мин его концентрация увеличивается до 2500 МЕ/мл и только потом постепенно снижается с периодом полувыведения 320–360 мин.

Важно отметить, что при инстилляциях раствора РПУ не было субъективных жалоб пациентов на наличие дискомфорта или жжения, а также признаков аллергической реакции в виде гиперемии и отека конъюнктивы. При выполнении субконъюн-

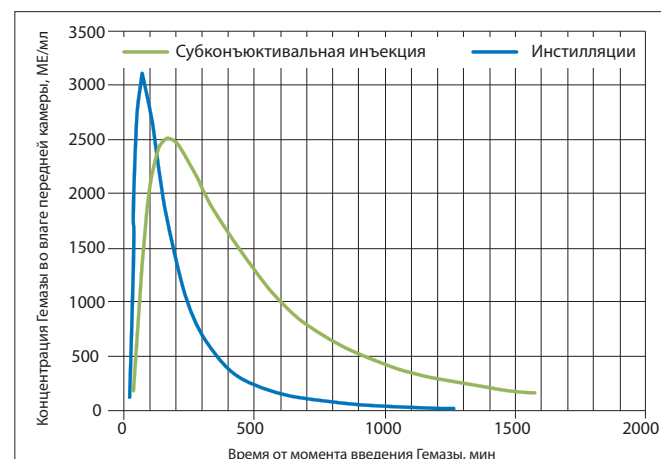


Рис. 2. Зависимость концентрации РПУ во влаге передней камеры от способа и времени ее введения.

ктивных инъекций в 7 (23 %) случаях отмечены гипосфагмы, которые полностью рассосались через 7–10 сут.

ОБСУЖДЕНИЕ

Чаще всего РПУ применяют субконъюнктивно в инъекциях, но этот инвазивный метод может сопровождаться субконъюнктивными кровоизлияниями, рубцеванием конъюнктивы в месте инъекции, особенно при неоднократном введении. Больной может испытывать болевые ощущения при поверхностной анестезии, собственно в момент инъекции, описаны осложнения, связанные с ятрогенным прободением фиброзной капсулы глаза [14]. Недостатки субконъюнктивного введения заставляют искать менее инвазивные способы введения, такие как форсированные инстилляции. Результат наших исследований показывает, что РПУ достаточно хорошо проникает во влагу передней камеры, как при форсированных инстилляциях, так и при субконъюнктивных инъекциях.

В 1-й группе в первые минуты после форсированных инстилляций концентрация препарата во влаге передней камеры значительно выше, чем при субконъюнктивном введении, но быстрее снижается. Это связано с тем, что при инстилляциях РПУ частично растворяется слезной жидкостью, элиминируется по ходу слезы и непосредственно после этого начинает проникать во влагу передней камеры, что исключает возможность формирования депо препарата. А при субконъюнктивных инъекциях, напротив, формируется депо, из которого фермент постепенно высвобождается и более длительное время, чем при инстилляциях, поступает во влагу передней камеры глаза. Поэтому в первые минуты количество РПУ во влаге передней камеры при субконъюнктивном введении меньше, чем при инстилляциях, но в последующем препарат дольше задерживается во влаге, о чем свидетельствует более длительный период полувыведения, чем при инстилляциях. При субконъюнктивной инъекции концентрация РПУ в первые 120–160 мин достигает максимального значения, которое на 15–20 % меньше, чем при форсированных инстилляциях. Однако при субконъюнктивной инъекции период полувыведения после достижения максимальной концентрации больше в 2,5 раза, чем при форсированных инстилляциях. Исходя из вышеизложенного можно утверждать, что наши исследования позволяют расширить диапазон лечебных возможностей как для врача, так и для пациента. Учитывая малую травматизацию и особенности элиминации препарата в течение 6–7 ч после форсированных инстилляций РПУ, можно утверждать, что данный метод перспективен для двукратного применения в день при необходимости добиться хорошего фибринолитического эффекта. В то же время при субконъюнктивном введении терапевтическая концентрация во влаге передней ка-

меры глаза держится дольше, примерно 16–17 ч, что позволяет рекомендовать однократную инъекцию в день. Кроме этого, стоит обратить внимание на то, что введение РПУ методом форсированных инстилляций пациент может осуществлять самостоятельно в амбулаторных условиях, без необходимости активного участия врачебного персонала, что исключено при инъекционном методе введения.

В зависимости от выраженности фибриноидного синдрома возможно применение того или другого метода введения препарата. В том случае, если в раннем послеоперационном периоде (в течение первых суток) отмечаются отложения единичных нитей фибрина на поверхности интраокулярной линзы или в просвете зрачка, возможно применение форсированных инстилляций раствора РПУ. В других случаях, если отмечается формирование фибринового сгустка в просвете зрачка или образование плотных задних синехий, целесообразно субконъюнктивное введение. Безусловно, может применяться и комбинация методов: в стационаре выполняют 1–2 субконъюнктивных инъекции, далее пациент применяет капли, находясь на амбулаторном лечении.

Методика инстилляций, примененная в исследовании, предусматривает непрерывное закапывание препарата в течение 10 мин. В амбулаторных условиях самим пациентом это трудновыполнимо, однако возможен следующий подход: общий объем инстилляций препарата в 15 мл с той же концентрацией в 5000 МЕ равномерно распределить по времени на закапывание в течение часа. Это будет более удобно для пациента и наиболее адаптировано для применения в амбулаторных условиях, хотя несколько изменит фармакокинетику препарата в сторону меньшей концентрации, но зато пролонгирует его действие.

ВЫВОДЫ

1. Введение РПУ для лечения фибриноидного синдрома может быть использовано практически равноценно как путем субконъюнктивных инъекций, так и методом форсированных инстилляций, что определяется достаточной концентрацией фермента во влаге передней камеры глаза.

2. Характер фармакокинетики терапевтической концентрации препарата во влаге передней камеры глаза предполагает однократное субконъюнктивное введение и допускает двукратное применение инстилляций в течение суток.

Литература/References

1. Даниличев В.Ф., Бойко Э.В., Сажин Т.Г. Энзимотерапия фибриноидного синдрома после экстракции катаракты. Офтальмохирургия. 2005; 3: 25–8.
Danilichev V.F., Boiko E.V., Sazhin T.G. Enzymotherapy of fibrinoid syndrome after cataract extraction. Ophthalmic surgery. 2005; 3: 25–8 (in Russian).
2. Jaffe G.J., Green G.D.J., McKay B.S., et al. Intravitreal clearance of tissue plasminogen activator in the rabbit. Archives of Ophthalmology. 1998; 106: 969–71.
3. Han D.P., Wang Q., Hartz A., et al. Postoperative fibrin formation and visual outcome after pars plana vitrectomy. Retina. 1999; 3: 225–30.

4. Бочаров В.Е., Иванов М.Н., Двали М.Л. Системное применение кортикостероидов для предупреждения фибринозного иридоциклита при артифакии. Вестник офтальмологии. 1993; 2: 17–9.
Bocharov V.E., Ivanov M.N., Dvali M.L. Systemic corticosteroid therapy for the fibrinoid syndrome prevention in patients with pseudophakia. Vestnik oftal'mologii. 1993; 2: 17–9 (in Russian).
5. Даниличев В.Ф. Офтальмология. Энзимотерапия и экстракорпоральная гемокоррекция. Санкт-Петербург; 2002.
Danilichev V.F. Ophthalmology. Enzymotherapy and extracorporeal hemocorrection. Sankt Petersburg; 2002 (in Russian).
6. Нарбут И.П., Нуриева С.М. Эффективность применения ферментов в лечении токсико-аллергических реакций после экстракции катаракты с имплантацией интраокулярных линз. Вестник офтальмологии. 1998; 5: 21–3.
Narbut I.P., Nurieva S.M. The efficacy of the using of enzymes for the treatment of toxic allergic reactions after cataract extraction and implantation of intraocular lenses. Vestnik oftal'mologii. 1998; 5: 21–3 (in Russian).
7. Волков В.В., Данилов А.В., Рapis Е.Г. Гемофтальм. Ленинград: Медицина; 1990.
Volkov V.V., Danilov A.V., Rapis E.G. Hemophthalmus. Leningrad: Meditsina; 1990 (in Russian).
8. Егоров А.Е., Нестеров А.П. Экспериментальное обоснование эффективности зон повышенной проницаемости в плоской части цилиарного тела, создаваемых с помощью диод-лазерных аппликаций. Клиническая офтальмология. 2001; 2: 44–6.
Egorov A.E., Nesterov A.P. Experimental approval of the efficacy of pars plana ciliary body zones of increased permeability after diod laser application. Klinicheskaya oftal'mologiya. 2001; 2: 44–6 (in Russian).
9. Янченко С.В. Длительная внутриартериальная инфузия лекарственных препаратов в лечении острой сосудистой оптической нейропатии. Ростов-на-Дону; 2003.
Yanchenko S.V. Prolonged intracarotid infusion of medications for the treatment of acute vessels optical neuropathy. Rostov-na-Donu; 2003 (in Russian).
10. Бойко Э.В., Даниличев В.Ф., Сажин Т.Г. Влияние способа введения «Гемазы» на эффективность лечения гемофтальма при диабетической ретинопатии. Офтальмологические ведомости. 2008; 2: 42–7.
Boiko E.V., Danilichev V.F., Sazhin T.G. The impact of the “Hemaza” introduction technique on the efficacy of the hemophthalm treatment in diabetic retinopathy. Oftal'mologicheskie vedomosti. 2008; 2: 42–7 (in Russian).
11. Damji K.F., Hill V. Tissue plasminogen activator for treatment of fibrin in endophthalmitis. Ophthalmology. 2001; 36 (5): 269–71.
12. Улащик В.С., Пономаренко Г.Н. Лекарственный электрофорез. Санкт-Петербург; 2010.
Ulashik V.S., Ponomarenko G.N. Medications electrophoresis. Sankt Petersburg; 2010 (in Russian).
13. Черикчи Л.Е. Физиотерапия в офтальмологии. Киев; 1979.
Cherikchi L.E. Physiotherapy in ophthalmology. Kiev; 1979 (in Russian).
14. Morgan C.M., Schatz H., Vine A.K. Ocular complications associated with injections. Ophthalmology. 1988; 95: 660–5.

A comparative study of pharmacokinetics of recombinant prourokinase in subconjunctival and drip methods of administration

E.V. Boyko², T.G. Sazhin¹, A.S. Suvorov¹, S.I. Alekperov³

¹S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

²S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Clinic, St. Petersburg, Russia

³State Research and Testing Institute of Military Medicine, St. Petersburg, Russia
Mr.Suvorov-08.04.88@mail.ru

Purpose: to compare the dynamics of recombinant prourokinase (RPU) in humor of the anterior chamber of the eye with regard to administration technique (instillations vs. subconjunctival injection) using fluorescent spectrophotometry. **Material and methods.** 62 samples of anterior chamber humor were obtained from 62 patients (62 eyes) who underwent cataract surgery, with rigid pupil due exfoliation syndrome or after an earlier acute iridocyclitis. The patients were divided into two groups. Group 1 received the medication by forced instillations of RPU solution with the concentration of 330 IU per 1 ml of 0.9 % sodium chloride continuously for 10 minutes, the rate being 30 drops per minute. Group 2 (31 patients, 31 eyes) received a subconjunctival injection of 0.5 ml of 0.9 % sodium chloride solution that contained 5,000 IU of RPU. For each sample, the time elapsed from the moment of RPU administration to the moment of humor sampling was noted. RPU concentration in the samples was determined by fluorescent spectrophotometry using the HITACHI 650–60 device (Japan). **Results.** In forced instillations, RPU is detected in the humor of the anterior chamber starting from the 5th minute after the instillation, with rapid growth of concentration, which attains the level of 3100 IU/ml in 30 to 60 minutes. Then, however, the concentration drops, with the half-life period being 160 to 180 minutes. In subconjunctival injections RPU is detected after the same time span after the procedure; however, its concentration grows for 120 to 160 minutes, reaching the level of 2500 IU/ml, and only then begins to fall gradually, the half-life period being as long as 320–360 minutes. **Conclusions.** RPU may be used for the treatment of fibrinoid syndrome with practically the same efficacy by subconjunctival injections or by force instillation. This is explained by the fact that the enzyme is found in anterior chamber humor in sufficient concentrations in either case. The pharmacokinetics of therapeutic concentration of the medicine in the humor of the anterior chamber envisages a single subconjunctival administration and permits two instillations in the 24-hour period.

Keywords: recombinant prourokinase, fibrinoid syndrome, fluorescent spectrophotometry.

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

For citations: Boyko E.V., Sazhin T.G., Suvorov A.S., Alekperov S.I.
A comparative study of pharmacokinetics of recombinant prourokinase in subconjunctival and drip methods of administration.
Russian ophthalmological journal. 2017; 10 (2): 18–22. (in Russian)
doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-2-18-22

Financial disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

Адрес для корреспонденции: 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ФГКВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ
mr.suvorov-08.04.88@mail.ru